

Том 60, Номер 6

ISSN 0016-6758  
Июнь 2024



# ГЕНЕТИКА



НАУКА  
— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 60, номер 6, 2024

---

---

## Обзорные и теоретические статьи

Метилирование ДНК при аневризме аорты различной локализации

*А. Н. Кучер, С. А. Шипулина, И. А. Гончарова, М. С. Назаренко*

3

---

## Молекулярная генетика

*L31*-транспозоны шестилучевых кораллов (*Hexacorallia*): распространение, разнообразие и эволюция

*Л. В. Пузакова, М. В. Пузаков, П. М. Пузакова*

22

---

## Генетика животных

Динамика системы В-хромосом в популяции восточноазиатской мыши

*Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая за 36-летний период

*И. А. Жигарев, Ю. М. Борисов*

31

Влияние хронического социального стресса на экспрессию генов, ассоциированных с нейротрансмиттерными системами в гипоталамусе самцов мышей

*И. Л. Коваленко, А. Г. Галямина, Д. А. Смагин, Н. Н. Кудрявцева*

44

Генетическое разнообразие пяти пород крупного рогатого скота по SNP-маркерам, ассоциированным с состоянием здоровья

*М.В. Бытов, В.Д. Зубарева, С.В. Вольская, А.Г. Исаева,  
Д.Ю. Нохрин, Ю.А. Осипова, О.В. Соколова*

55

Хромосомный полиморфизм малярийных комаров Карелии и расширение северных границ видовых ареалов

*А. В. Москаев, А. Г. Бега, В. И. Панов, В. П. Перевозкин, М. И. Гордеев*

62

Генетическая диагностика предполагаемых гибридов волка и обыкновенного шакала

*П. А. Казимиров, Ю. С. Белоконь, М. М. Белоконь, А. С. Мишин, В. В. Стахеев,  
Ю. А. Яровенко, А. Ю. Яровенко, Д. В. Политов*

72

---

## Генетика человека

- Палеоазиатский субстрат в генофонде коряков по данным о полиморфизме аутомных SNP и гаплогруппам Y-хромосомы  
*В. Н. Харьков, Н. А. Колесников, А. А. Зарубин, Л. В. Валихова, И. Ю. Хитринская, М. И. Воевода, М. А. Губина, А. Л. Сухомясова, В. А. Степанов* 81
- Генетико-антропологическое исследование погребения 93 Тольёнского могильника. Удмуртия, полемская археологическая культура  
*Е. В. Веселовская, Ю. В. Рашковская, А. С. Демин, Х. Х. Мустафин, И. Э. Альборова* 92
- Ассоциированный с гипертрофической кардиомиопатией новый вариант со сдвигом рамки считывания в гене *MYBPC3* определяет значительное снижение уровня транскрипта этого гена в миокарде  
*И. С. Киселев, М. С. Козин, Н. М. Баулина, М. Б. Шарипова, А. С. Зотов, Е. А. Степанова, Э. В. Курилина, Г. Ж. Абдуллаева, Д. А. Затейщиков, О. О. Фаворова, О. С. Чумакова* 106
- 

## Краткие сообщения

- Анализ эффективности CRISPR/CAS9-редактирования рибонуклеопротеидными комплексами гена *GEX2* в протопластах кукурузы  
*Е. М. Моисеева, В. В. Фадеев, Ю. В. Фадеева, Ю. С. Гусев, М. И. Чумаков* 117

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

© 2024 г. А. Н. Кучер<sup>1</sup>, С. А. Шипулина<sup>1</sup>, И. А. Гончарова<sup>1</sup>, М. С. Назаренко<sup>1</sup>, \*

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

\*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 25.01.2023 г.

Аневризма аорты (АА) – жизнеугрожающее патологическое состояние, осложнение которого в виде разрыва аорты в отсутствие экстренного хирургического вмешательства приводит к летальному исходу. В развитие АА вносят вклад генетические (чаще при торакальной АА – ТАА) и средовые (при ТАА и абдоминальной АА – ААА) факторы. В настоящем обзоре обобщены данные научных публикаций, посвященных изучению метилирования ДНК при воздействии факторов риска АА, а также в клетках различных отделов аорты (грудной, брюшной) в норме и при патологических состояниях. Изменение метилирования ДНК наблюдается в клетках аорты и/или крови при наличии факторов риска АА (артериальная гипертензия, курение, возраст, наличие сопутствующих заболеваний). Исследования метилирования ДНК при ТАА и ААА немногочисленны, проводились с использованием различных подходов к формированию выборок, выбору образцов клеток и экспериментальных методов. Однако они убедительно свидетельствуют об измененном статусе метилирования ДНК генов, выбранных для исследования с использованием кандидатного подхода (при исследовании ААА), а также различных регионов генома при проведении широкогеномного анализа метилирования ДНК (преимущественно при исследовании ТАА). Гены, локализованные в дифференциально-метилованных регионах, связаны с функционированием сердечно-сосудистой системы, вовлечены в клеточные и метаболические процессы, патогенетически значимые для развития АА. В ряде случаев установлена связь уровней метилирования ДНК с клиническими параметрами при АА. Эти результаты указывают на перспективность расширения исследований метилирования ДНК при АА, в том числе и с целью выявления новых патогенетически значимых звеньев при развитии АА.

*Ключевые слова:* аневризма аорты, грудная аорта, брюшная аорта, метилирование ДНК, эпигенетика, эпигенетические модификации.

**DOI:** 10.31857/S0016675824060018 **EDN:** BYFOJE

Аневризма аорты (АА) – жизнеугрожающая патология, при которой могут поражаться различные сегменты аорты [1–3]. По локализации выделяют аневризму грудной (торакальная АА – ТАА), брюшной (абдоминальная АА – ААА) аорты и аневризму смешанного типа, когда патологический процесс затрагивает и грудной, и брюшной отделы аорты (торакалоабдоминальная АА – ТААА) [4].

Согласно данным мета-анализа популяционных исследований, во всем мире совокупная частота и распространенность ТАА составляют 5.3 на 100 000 человек в год (95% CI: 3.0; 8.3) и 0.16% (95% CI: 0.12; 0.20) соответственно [2]. По данным скрининговых исследований частота выявления ААА в разных популяциях варьирует от 3.3 до 7.7% у лиц

в возрастной когорте 64–83 года [5]. АА могут длительное время формироваться бессимптомно до разрыва аорты, при котором смертность достигает 80–90% [2, 6].

В развитие АА вносят вклад как генетические, так и средовые факторы, в том числе и факторы внутренней среды, формирующиеся при развитии патологических состояний (инфекционных заболеваний, болезней сердечно-сосудистой системы) [4, 7, 8]. Генетические причины выявляются в 20–30% случаев развития ТАА и в настоящее время молекулярно-генетическое обследование рекомендовано для формирования групп риска и оптимизации тактики ведения пациентов, а также каскадного скрининга членов их семей [4, 9].

У пациентов с ААА также выявляют патогенные варианты, характерные для ТАА [10], несмотря на то, что генетические факторы не рассматриваются в качестве основных факторов риска развития аневризмы брюшной аорты [4, 11].

В отличие от генетических факторов, которые информативны для оценки риска развития заболевания, прогноза характера его течения и определения тактики ведения пациентов в зависимости от их генетических особенностей [11], эпигенетические модификации, с одной стороны, могут являться маркерами развития патологии и/или стадии патологического процесса, а с другой, – будучи в ряде случаев обратимыми рассматриваются в качестве перспективных молекулярных маркеров для терапевтического воздействия [12–16].

То, что эпигенетические события могут быть вовлечены в патогенез АА подтверждают клинические и экспериментальные наблюдения [15, 17]. У пациентов с АА также регистрируют различные эпигенетические изменения (на уровне метилирования ДНК, модификации гистонов, ремоделирования хроматина, а также экспрессии различных регуляторных РНК), в том числе и при генетически обусловленных аортопатиях [12, 13, 18–25].

Выявление молекулярно-клеточных механизмов, включая эпигенетические события, в сложном патогенезе АА приобретает все большее значение, в том числе и с целью поиска новых фармакологических возможностей блокады ключевых путей патогенеза данного заболевания [8, 26, 27].

Метилирование ДНК – один из основных механизмов эпигенетических модификаций генома, в отношении которого на сегодняшний день собрано существенное количество информации. Тем не менее из-за немногочисленности тематических исследований, а также высокой гетерогенности выборок и различий в используемой методологии анализ результатов этих исследований является нетривиальной задачей. В связи с этим цель настоящего обзора заключалась в обобщении данных исследования метилирования ДНК при аневризме аорты различной локализации.

Поиск научных публикаций проводился в отечественной (Научная электронная библиотека – eLIBRARY.RU) и зарубежной (PubMed) электронных библиотеках. Для поиска публикаций использовали следующие слова (и их сочетания): аневризма аорты, аневризма грудной аорты, аневризма брюшной аорты, факторы риска, распространенность/эпидемиология, метилирование ДНК, эпигенетика, эпигенетические модификации (aneurysm, thoracic aortic aneurysm, abdominal aortic aneurysm, risk factors, prevalence/epidemiology, DNA methylation, epigenetics, epigenetic modifications).

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ АНЕВРИЗМЫ АОРТЫ

ТАА и ААА различаются по ключевым факторам риска и основным клеточным механизмам [4, 27, 28], несмотря на некоторую схожесть патологического процесса (характерны прогрессирующая дилатация стенки сосуда, чему способствуют апоптоз гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов (ГМКС) и ограниченная пролиферация, а также нарушение синтеза и деградации компонентов внеклеточно-матрикса, в том числе и вследствие воспаления, разрушающе действующего на стенку сосуда) [28]. Актуальность рассмотрения факторов риска АА в связи с целью заявленного обзора обусловлена тем, что многие как внешне-средовые воздействия (курение, прием лекарственных препаратов, особенности диеты и др.), так и изменения вследствие происходящих в организме физиологических и патологических процессов (старение, воспалительный процесс, атеросклероз, физическая активность и др.) могут сопровождаться эпигенетическими модификациями, в том числе и на уровне метилирования ДНК.

Уровень метилирования ДНК изменяется в различных тканях при артериальной гипертензии, атеросклерозе (противоречивые данные о значении данной патологии в детерминации риска развития АА), сахарном диабете (рассматривается как протективный фактор развития АА), дислипидемиях, воспалении, с возрастом, у курящих и т.д. [29–38]. Так, показано, что общий уровень метилирования ДНК снижен в клетках крови у пациентов с артериальной гипертензией, являющейся важным фактором риска развития АА, по сравнению со здоровыми индивидами [39]. Более того, однонуклеотидные варианты (SNP), ассоциированные с уровнем артериального давления, располагаются в регионах, обогащенных CpG-сайтами, в том числе рядом с генами, являющимися важными для работы гладкомышечных клеток сосудов (*IGFBP3*, *KCNK3*, *PDE3A*, *PRDM6*), и в генах, связанных с функцией почек (*ARHGAP24*, *OSRI*, *SLC22A7*, *TBX2*) [40].

Измененный статус метилирования ДНК в клетках крови и сосудов (в том числе аорты) зарегистрирован у пациентов с атеросклерозом [32, 34], причем уровень метилирования ДНК при атеросклерозе коррелирует с патогенетическими процессами [41]. Рассматривают разные механизмы, посредством которых запускается патогенез при атеросклерозе, среди которых есть значимые для развития АА, такие как воспаление, эндотелиальная дисфункция, пролиферация гладкомышечных клеток сосудов и др. [41]. Действительно, установлено, что модификация метилирования ДНК контролирует функцию ГМКС, регулируя экспрессию генов, участвующих в атерогенезе [42]. Среди чувствительных к статусу метилирования ДНК

функций ГМКС – переключение с сократительно-го на синтетический фенотип, дифференцировка, пролиферация и миграция, т.е. те процессы, которые выступают в качестве критических и при развитии АА [4, 27, 28, 43]. В атеросклеротически пораженных артериях по сравнению с непораженными сосудами зарегистрировано изменение уровня метилирования CpG-сайтов генов микроРНК [32], среди которых и микроРНК, вовлеченные в различные этапы атерогенеза [44].

С возрастом, который рассматривается в качестве риска развития АА, регистрируют изменения, с одной стороны, статуса метилирования ДНК [45], а с другой, – функционального состояния ГМКС [46]. Показано, что у лиц с нормальным (трехстворчатый) аортальным клапаном возраст сам по себе способен негативно влиять на гладкомышечные клетки в стенке восходящей аорты, в результате чего ГМКС с возрастом переключаются с сократительного фенотипа на дезадаптивные синтетические или стареющие состояния [46]. Такие функциональные изменения могут выступать в качестве одного из факторов, способствующих развитию АА при других неблагоприятных условиях.

Внешнесредовые факторы риска развития АА также связаны с изменением метилирования ДНК. Курение оказывает существенное влияние на уровень метилирования ДНК [44, 47, 48]. Например, регулярное курение способствует повышению метилирования ДНК клеток крови в области промоторного региона гена *NOS1AP*, причем более высокое метилирование данного региона также наблюдали у пациентов с внутрисердечной аневризмой по сравнению с группой лиц с артериовенозной мальформацией сосудов (АМС) головного мозга [47]. Кроме того, гендерные различия по уровню метилирования данного гена установлены в контрольной группе (у мужчин выше, чем у женщин) и в группе пациентов с АМС головного мозга (у женщин выше, чем у мужчин) [47]. При этом мужской пол рассматривается в качестве фактора риска развития ААА [4], а мужчины и женщины различаются по частоте регистрации синхронной и метасинхронной ТАА у пациентов с ААА [2].

Обобщению результатов исследований, посвященных изучению эпигенетических модификаций, сопровождающих различные факторы риска (артериальная гипертензия, курение, возраст), этапы и метаболические пути, значимые для патогенеза АА (воспаление, гемоцистеинемия, поляризация моноцитов/макрофагов, протеолиз), посвящен ряд обзоров [18, 49, 50].

Кроме того, выявлена вовлеченность ферментов, участвующих в эпигенетических процессах (в том числе и на молекулярном уровне), в патогенетически значимые в отношении АА события [25, 51, 52].

Таким образом, связь метилирования ДНК с факторами риска развития АА, а также измененный уровень экспрессии генов, продукты которых вовлечены в процесс метилирования ДНК, указывают на потенциальную значимость данной эпигенетической модификации в развитии патологии.

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ПРИ АНЕВРИЗМЕ ГРУДНОЙ И АБДОМИНАЛЬНОЙ АОРТЫ

Публикации, посвященные анализу метилирования ДНК при развитии АА, немногочисленны (табл. 1), особенно с учетом полиэтиологичности и высокой клинической гетерогенности данных аортопатий. Всего в доступной литературе обнаружено семь исследований, посвященных изучению метилирования ДНК при ТАА [33, 53–58] и восемь работ – при ААА [20, 21, 59–64].

Исследования метилирования ДНК при ТАА проводились в образцах цельной ткани аорты или в эндотелиальных и гладкомышечных клетках аорты (при проведении исследований по оценке влияния *in vitro* колебательного и ламинарного потоков на статус метилирования ДНК), в срезах правого предсердия и в одном исследовании оценивался статус метилирования внеклеточной ДНК в плазме крови (табл. 1). При ААА, напротив, преобладали исследования по оценке статуса метилирования ДНК в клетках крови, и лишь в трех сообщениях приводятся данные по уровню метилирования ДНК в тканях/клетках брюшной аорты. В целом, несмотря на меньшее число исследований, изученные выборки пациентов с ТАА оказались более гетерогенными по клиническим показателям, чем таковые с ААА. Анализируемые выборки различались по половозрастному составу, статусу курения, наличию сопутствующих патологий (включая двухстворчатый аортальный клапан), что могло сказаться на оценках метилирования ДНК, но это не всегда и не по всем параметрам принималось во внимание при описании полученных данных. Гетерогенность в критериях формирования выборки, разные подходы к выбору тканей для анализа, клеточная гетерогенность образцов тканей, а также отличия по использованным экспериментальным методам оценки уровня метилирования ДНК (от изучения отдельных генов до полногеномного анализа) и подходам к обработке данных (табл. 1), делают проблематичным прямое сопоставление результатов разных исследований. В то же время на основании анализа публикаций можно сделать некоторые заключения.

Прежде всего следует отметить, что при развитии АА вне зависимости от ее локализации происходит изменение метилирования ДНК на уровне отдельных CpG-сайтов (и не-CpG-сайтов), отдельных генов и регионов генома (табл. 1). Статус метилирования ДНК различен между образцами

**Таблица 1.** Уровень метилирования ДНК в клетках аорты и крови у пациентов с аневризмой аорты различной локализации, а также в клетках аорты у модельных животных

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА ГРУДНОЙ АОРТЫ</b>			
Пациенты с ДАК-НР (ДА < 40 мм) (n = 7; 60 лет; 4 муж., 3 жен.) // пациенты с ТАК-НР (ДА < 40 мм) (n = 10; 72 года, 6 муж., 4 жен.)* {А} [56]	Образцы интима-медиа восходящей аорты	Шумина 450К	Между ДАК-НР и ТАК-НР не выявлено отдельных ДМ CpG-сайтов (ДМС), но зарегистрирован 681 геномный кластер ДМС (ДМР), относящихся к 894 генам. Для 540 ДМГ различия метилирования наблюдались в пределах ± 10%, из них в ДАК-НР 154 генов были гипер-М, а 398 гипо-М
Пациенты с ДАК-Р (ДА > 45 мм) (n = 14; 61 год; 11 муж., 3 жен.) // пациенты с ТАК-Р (ДА > 45 мм) (n = 13; 63 года; 7 муж., 6 жен.)* {А} [56]	Образцы интима-медиа восходящей аорты		Степень гипо-М выше в аорте ДАК-Р, чем в аорте ТАК-Р (в т.ч. и для транскрипционно-значимых CpG-сайтов внутри CpG-островков в пределах первых экзонов). Всего между ДАК-Р и ТАК-Р зарегистрировано 3 170 ДМР, содержащих 12 234 CpG-сайта и охватывающих 2 638 генов. В ДАК-Р метилирование 8 355 (68%) CpG-сайтов снижено
	Образцы интима-медиа восходящей аорты и правой внутренней грудной артерии		Между ДАК-Р и ТАК-Р метилирование различалось по 39 984 CpG-сайтам; при ТАК-Р чаще регистрировали гипер-М CpG; в аорте ДАК-Р средний уровень метилирования ниже, гипо-М ДМР в ДАК-Р связаны с 3 052 генами
Пациенты с ДАК // пациенты с ТАК [53]	Ткани аневризмы восходящей аорты	Шумина 450К	ДМ установлено для 27 CpG-сайтов в 9 генах; наибольшие различия по уровню метилирования выявлены для гена <i>RTPN22</i> (гипер-М); ген <i>ASTA2</i> также был ДМ.

Таблица 1 (продолжение)

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА ГРУДНОЙ АОРТЫ</b>			
<p>Пациенты с РГА (тип А), без семейной отягощенности (ДА = 52/57 мм) (n = 6; 45.3 лет; 5 муж., 1 жен.) {B} // здоровые индивиды (n = 6; 42.8 лет; 6 муж.) [33]</p>	<p>Образцы интима-медиа восходящей аорты</p>	<p>Полногеномное бисульфитное секвенирование (WGBS)</p>	<p>Между пациентами с РГА и здоровыми индивидами идентифицировано 51 468 ДМР (22 318 гипер-М и 29 150 гипо-М в РГА, из них 3 314 (6.44%) расположены в промоторных областях (от 1 до 2 500 пн выше сайта начала транскрипции). 300 ДМР (включая 14 365 CpG со средней длиной 1 648 пн; большинство расположены в межгенных областях, медиана расстояния до ближайшего гена – 58 305 п.н.) дифференцируют группу РГА от здоровых индивидов</p>
<p>Пациенты с РГА (тип А), без семейной отягощенности (ДА = 52/57 мм) (n = 6; 41.8 лет; 5 муж., 1 жен.) {B} // здоровые индивиды (n = 4; 36.5 лет; 3 муж., 1 жен.) [33]</p>			<p>15 из 200 наиболее ДМР локализованы в кластерах Нох-генов, включая кластер <i>НОХА</i> (на хромосоме 7), кластер <i>НОХВ</i> (на хромосоме 17), кластер <i>НОХС</i> (на хромосоме 12) и кластер <i>НОХД</i></p>
<p>Пациенты с РГА (тип А) без семейной отягощенности (ДА = 52/57 мм) (n = 7; 51 год; 6 муж., 1 жен.) {B} // здоровые индивиды (n = 4; 49.3 лет; 3 муж., 1 жен.) [33]</p>	<p>Плазма крови</p>		<p>3 982 ДМР вкДНК (8.8%) перекрываются с ДМР, идентифицированными в ткани аорты (тДМР); 2 326 ДМР вкДНК (12 856 ДМ сайтов) имели тот же паттерн метилирования, что и тДМР; из них 34 ДМР общие с 300 ДМР в тДМР</p>

Таблица 1 (продолжение)

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА ГРУДНОЙ АОРТЫ</b>			
Пациенты с ДАК, связанным с аневризматической дилатацией (ДА > 45 мм) (n = 5 муж.; 53.8 лет) * {BCO} // здоровые доноры органов (n = 6 муж.; 36.7 лет) * {BCO} [55]	Ткани восходящей аорты	Illumina 450K	<p>При остром разрыве аорты изменяется метилирование ДНК в сайтах, отличных от CpG.</p> <p>Между PGA и контрольной выборкой выявлено 706 ДМ цитозинов (ДМЦ) (396 или 56% гипер-М при РА), между ДАК и контрольной выборкой – 3 775 ДМЦ (1 979 или 52% гипер-М при ДАК); между ДАК и PGA – 12 817 ДМЦ (75% гипер-М при ДАК)</p>
Пациенты с острым PGA (n = 10 муж.; 52.4 лет) //; здоровые доноры органов (n = 6 муж.; 36.7 лет) [55]	AoSMC (ENCODE)		<p>Профили метилирования ДНК PGA больше отклоняются от профилей метилирования AoSMC (ENCODE), чем профили метилирования контрольной группы. Профили метилирования ДНК ДАК не отличаются значимо от метилирования ДНК AoSMC</p>
Пациенты с острым PGA (n = 4 муж.; 49,1 лет) {B} // здоровые доноры органов (n = 4 муж.; 47,92 лет) {B} [58]	Ткани восходящей аорты	Illumina 450K	Обнаружено 589 ДМС (315 гипо-М и 274 гипер-М)

Таблица 1 (продолжение)

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА ГРУДНОЙ АОРТЫ</b>			
Пациенты с синдромом Бругада ( <i>n</i> = 30; 67 лет; 17 муж., 13 жен.) с разными генотипами по H558R гена <i>SCN5A</i> [54]	Срезы правого предсердия	Таргетное бисульфитное секвенирование	Уровень метилирования в среднем и для 13-ти из 16-ти изученных CpG в регионе промотора гена <i>SCN5A</i> ниже в срезах миокарда с вариантом H558R+, чем в срезах H558R- (0.7% vs. 1.6%)
Пациенты с ДАК и расширенной (ДА > 45 мм) аортой (ДАК-Р; <i>n</i> = 14; 61 год; 11 муж., 3 жен.) {А} // пациенты с ТАК и расширенной (ДА > 45 мм) аортой (ТАК-Р; <i>n</i> = 13; 63 года; 7 муж., 6 жен.) * {А} [56]	Первичные эндотелиальные клетки аорты (ЭКА) из большой кривизны аневризмы грудной аорты	Шумина 450К	При воздействии колебательного потока изменялось метилирование 4 707 генов в ЭКА ДАК-Р и 5 999 генов в ЭКА ТАК-Р
Воздействие колебательного (двунаправленного, 12 дин/см <sup>2</sup> ) или ламинарного (12 дин/см <sup>2</sup> ) потока на эндотелиальные клетки EA.hu926 ( <i>n</i> = 9) [56]	Эндотелиальные клетки человека (EA.hu926)	Шумина 450К	Ламинарный и колебательный потоки по-разному влияли на метилирование ДНК в клетках EA.hu926. При колебательном потоке зарегистрировано 1 644 гипер-М и 169 гипо-М региона. Профиль ДМ ДНК в аорте ДАК-НР в большей степени схож с профилем метилирования колебательного (207, или 23% общих ДМГ), чем ламинарного (163 или 18% общих ДМГ) потока

Таблица 1 (продолжение)

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА БРЮШНОЙ АОРТЫ</b>			
<p>Пациенты с ААА (<i>n</i> = 32; 26 муж., 6 жен.; 73.13 лет) // умершие доноры органов без поражения абдоминальной аорты (<i>n</i> = 32; 69.56 лет; 21 муж., 11 жен.) [60]</p>	<p>Ткани брюшной аорты</p>	<p>Sequenome Mass Array</p>	<p>12 из 17 изученных CpG-сайтов в регионе CpG-островка в промоторе гена <i>SOST</i> гипер-М в образцах ААА (уровень метилирования – 79.23%) по сравнению с контрольной группой (уровень метилирования – 61.33%)</p>
<p>Мужчины с ААА (<i>n</i> = 24, старше 65 лет; 22 – курящие) {С} // умершие доноры органов, все – курившие (<i>n</i> = 20; 16 муж., 4 жен., медиана возраст – 56 лет) {С} [21]</p>	<p>ГМК из аорты</p>	<p>Бисульфитное секвенирование</p>	<p>ААА и контрольная выборка различались по метилированию четырех генов (<i>ERG</i>, <i>IL6R</i>, <i>SERPINB9</i> и <i>SMYD2</i>); не установлено различий для генов <i>DAB2IP</i>, <i>LDLR</i>, <i>LRPI</i>, <i>MMP9</i>, <i>SORT1</i> и альтернативного промотора <i>ERG</i>. В локусах, значимых для формирования развития риска ААА (по GWAS), в ГМК в регуляторных регионах установлено гипо-М в четырех CpG-сайтах гена <i>SMYD2</i> (ААА – 37.06%, контроль – 48.75%), гипер-М – в 2 CpG гена <i>IL6R</i> (ААА – 89%, контроль – 74.85%) и 13 CpG-сайтов гена <i>ERG</i> (ААА – 23.8%, контроль – 8.67%); в гене <i>SERPINB9</i> шесть CpG-сайтов гипо-М и один CpG-сайт гипер-М. Различия по уровню метилирования между ААА и контролем связаны со статусом курения для двух CpG-сайтов гена <i>ERG</i>, с полом пациентов – для одного CpG гена <i>ERG</i> и одного CpG-сайта гена <i>SMYD2</i></p>

Таблица 1 (продолжение)

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА БРЮШНОЙ АОРТЫ</b>			
Мужчины с AAA ( <i>n</i> = 5; 66.4 лет) // соседние непораженные участки аорты тех же пациентов [62]	Интима и медиа аорты	Бисульфитное секвенирование	Процент метилированных CpG-сайтов в промоторе гена, кодирующего SM22α ( <i>TAGLN</i> ), значительно выше в образцах AAA человека и в образцах AAA мыши, индуцированной Ang II, чем в соответствующих контрольных образцах
Самцы мышей дикого типа, C57BL/6J и ApoE <sup>-/-</sup> с индуцированной Ang II или CaCl <sub>2</sub> AAA ( <i>n</i> = 13) // непораженные участки аорты от тех же особей [62]	Образцы пораженных и непораженных участков аорты		
Мужчины с AAA ( <i>n</i> = 116, 65 лет) // Мужчины без AAA ( <i>n</i> = 230; 65 лет) [64]	Венозная кровь	MethylFlash™ Global DNA methylation (5-mc) ELISA Easy kit	У мужчин с AAA более высокое глобальное метилирование ДНК по сравнению с мужчинами без AAA
Мужчины с AAA с (и без) разрывом(а) аорты ( <i>n</i> = 43; 71.35 лет) {C} // здоровые мужчины ( <i>n</i> = 34; 60.0 лет) {C} [63]	Венозная кровь	Метил-специфичная ПЦР	Ген <i>MMR2</i> метилирован у четырех (9.3%), <i>TIMP2</i> – у одного (2.3%), ген <i>TIMP1</i> – у трех (7.0%), ген <i>MMR9</i> – у 40 (93.0%) пациентов с AAA. В контрольной группе ген <i>MMR2</i> метилирован у двух (5.9%), гены <i>TIMP2</i> и <i>TIMP1</i> – у двух (по 5.9% каждый), ген <i>MMR9</i> – у 31 (91.2%) индивида

Таблица 1 (окончание)

Основная группа // контрольная группа	Ткань / клетки	Метод	Основные заключения
<b>АНЕВРИЗМА БРЮШНОЙ АОРТЫ</b>			
Мужчины с ААА (43–88 лет; 11 – курящие (68.1 лет), 9 – некурящие (78.3 лет)) // женщины без ААА (10 – курящие (55.7 лет), 11 – некурящие (67.3 лет)) [59]	Мононуклеарные клетки крови	Illumina 450K	Для четырех генов зарегистрирован разный уровень метилирования ДНК между образцами ААА и контроля: при ААА метилирование снижено для <i>ADCY10P1</i> и <i>CNN2</i> , повышено для <i>KLHL35</i> и <i>SERPINB9</i>
Мужчины с ААА ( $n = 92$ ; старше 65 лет, курившие не менее 10 лет) {C} // мужчины без ААА ( $n = 93$ ; медиана возраста – 68 лет; ДА < 25 мм) {C} [21]	Мононуклеарные клетки крови	DNA methylation kit (Epigentek Group Inc.), ELISA	У лиц с большим диаметром ААА выявили гипер-М: при ААА > 55 мм глобальный уровень метилирования – 1.86%; при ААА 30–55 мм – 0.93%; в К. – 0.79%. Процент метилирования положительно коррелировал с диаметром ААА
Пациенты с ААА ( $n = 101$ ; 66.7 (42–87) лет, 84 муж., 17 жен.) // здоровые индивиды ( $n = 102$ ; 65.51 лет, 86 муж., 16 жен.) {B} [20]	CD3+ Т-лимфоциты	DNA methylation kit (Epigentek Group Inc.), ELISA	У пациентов с ААА ДНК Т-клеток гипо-М по сравнению с контрольными образцами (1.070 vs. 1.719)
Пациенты с ААА ( $n = 32$ ; 63.9 лет; 27 муж., 5 жен.) {B} // здоровые индивиды ( $n = 30$ , 60.5 лет; 26 муж., 4 жен.) [61]	CD4+ и CD25+ регуляторные Т-клетки (Treg)	DNA methylation kit (Epigentek Group Inc.), ELISA	Уровень метилирования ДНК Treg значительно выше у пациентов с ААА, чем в контрольной выборке (0.159 vs. 0.098)

Примечание/ \* Данные были скорректированы на возраст. ДАК – двустворчатый аортальный клапан; ТАК – трехстворчатый аортальный клапан; ТАК-НР и ДАК-НР – нерасширенная аорта при трехстворчатом и двустворчатом аортальном клапане соответственно; ТАК-Р и ДАК-Р – расширенная аорта при трехстворчатом и двустворчатом аортальном клапане соответственно; РГА – расслоение грудной аорты; ААА – абдоминальная аневризма аорты; К. – контроль; ДМ, ДМГ, ДМР – дифференциально-метилированные гены, дифференциально-метилированные регионы соответственно; ДМЦ – дифференциально-метилированные цитозины; гипо-М – гипометилированные; гипер-М – гиперметилированные; вкДНК – внеклеточная ДНК; ЭКА – эндотелиальные клетки аорты; AoSMC (aortic smooth muscle cell) – гладкомышечные клетки аорты, ГМК – гладкомышечные клетки сосудов; ДА – диаметр аорты; {A} – исключены пациенты с синдромальной патологией аорты, расслоением и/или значительным поражением коронарных артерий; {B} – исключены пациенты с синдромами Элерса–Данлоса, Марфана, другими заболеваниями соединительной ткани; {BCO} – без семейной отягощенности; {C} – европеоиды.

тканей аорты пациентов с двухстворчатым (ДАК) и трехстворчатым (ТАК) аортальным клапаном (при нормальной и расширенной аорте), изменяется при воздействии колебательного потока и отличается у пациентов с ААА, ТАА по сравнению с контролем и при расслоении грудной аорты при сравнении как с контрольными образцами, так и с некоторыми аортопатиями (табл. 1).

Среди дифференциально метилированных генов, выявленных между образцами аорты пациентов с ДАК и ТАК (в обоих случаях с нерасширенной аортой) и между эндотелиальными клетками, подвергшимися воздействию колебательного и ламинарного потоков, большее сходство наблюдалось для неблагоприятных с точки зрения развития АА условий, а именно – для аорты пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном и при воздействии колебательного потока [56]. Иными словами, изменения метилирования ДНК в клетках регистрируются до развития патологии аорты у пациентов с предрасполагающими анатомическими особенностями и при воздействии провоцирующих факторов (двухстворчатый клапан).

У пациентов с расширенной грудной аортой при ее расслоении изменялся характер метилирования ДНК на уровне геномных регионов: идентифицировано 51 468 дифференциально метилированных регионов генома (22 318 регионов были гиперметилированы и 29 150 – гипометилированы в ткани пораженной аорты), большинство из которых локализованы в межгенных регионах и лишь 3 314 (6,44%) – в областях промоторов генов [33].

Pan S. с соавт. [55] в клетках восходящей аорты при ее остром расслоении установлено изменение паттерна метилирования в сайтах, отличных от CpG. Так, между образцами аорты с расслоением (РА) и контрольными образцами зарегистрированы различия по метилированию 706 цитозинов (ДМЦ), из которых 56% были гиперметилированы при РА. При сравнении образцов тканей аорты от пациентов с двухстворчатым клапаном и аневризматической дилатацией (ДАК-Р) с контролем дифференциально-метилированными были 3 775 сайтов (52% были гиперметилированы при ДАК-Р), при сравнении с образцами от пациентов с РА выявлены 12 817 дифференциально-метилированных цитозинов (75% были гиперметилированы при ДАК-Р) [55]. Интересно, что среди дифференциально метилированных цитозинов, выявленных при сравнении образцов от пациентов с РА и от здоровых доноров органов, наблюдали 34-кратное обогащение не-CpG-сайтов, ассоциированных с возрастом ( $n = 122$ ,  $P < 1e-100$ , практически все гипометилированы при патологии), потеря метилирования и сверхобогащение ассоциированных с возрастом не-CpG-сайтов (но менее выраженное) зарегистрированы также при сравнении образцов ДАК-Р и контроля, но не

наблюдались между двумя группами патологий – между ДАК-Р и РА [55]. Эти данные согласуются с тем, что возраст рассматривается в качестве одного из значимых факторов риска развития АА и ее осложнений.

Все приведенные выше примеры изменения метилирования ДНК при ТАА получены на образцах аорты. Лишь в одном исследовании [33] анализировалась внеклеточная ДНК плазмы крови у пациентов с расслоением грудной аорты и здоровых доноров. Так, Liu P. с соавт. [33] удалось показать высокую специфичность профиля метилирования внеклеточной ДНК у пациентов с расслоением грудной аорты по сравнению с контрольной группой, что позволило авторам высказать предположение о возможности использования этого показателя в качестве неинвазивного биомаркера для прогнозирования заболевания.

Согласно данным анализа обогащения генов, ассоциированных с дифференциально-метилированными участками генома в аорте при ТАА, можно предположить, что эти эпигенетические изменения функционально значимы, так как затрагивают процессы, важные для функционирования сердечно-сосудистой системы [33, 56]. Кроме того, данные об изменении статуса метилирования ДНК наряду с дифференциальной экспрессией могут быть информативны для выявления диагностических маркеров при АА и ее осложнениях. Так, наряду с дифференциальным метилированием были выявлены 77 дифференциально экспрессирующихся генов у пациентов с острым расслоением аорты типа А [57]. Из числа этих генов на основании анализа сети межбелковых взаимодействий выделены пять ключевых (узловых) (при остром расслоении грудной аорты гены *MYC*, *ITGA2* и *RND3* активировались, а *BCL2* и *PHLPP2* подавлялись), которые посредством регуляции иммунного воспаления и реакции на окислительный стресс могут участвовать в патогенезе расслоения аорты. По мнению авторов процитированного исследования, это свидетельствует о высокой диагностической значимости данных маркеров.

Анализ метилирования ДНК при ААА проводился с использованием несколько иных подходов, чем при изучении ТАА: преобладали исследования на клетках крови и оценивались либо интегральный показатель метилирования ДНК, либо метилирование генов, продукты которых вовлечены в патогенез аневризмы (табл. 1). Различия по метилированию ДНК наблюдали между индивидами с ААА и без поражения брюшной аорты в образцах тканей и гладкомышечных клеток сосудов брюшной аорты, Т-клетках, регуляторных Т-клетках, мононуклеарах и клетках цельной крови (табл. 1).

По сравнению с контролем в биоптатах брюшной аорты с аневризмой гиперметилирование

зарегистрировано для 12 из 17 изученных CpG-сайтов в CpG-островке, локализованном в промоторе гена *SOST* [60]. *SOST* играет защитную роль в поддержании гомеостаза аорты путем ингибирования воспаления и деградации внеклеточного матрикса; при этом снижение уровня *SOST* активирует Wnt/ $\beta$ -catenin сигнальный путь, регулируя тем самым гены, важные для поддержания целостности стенки аорты [60].

В мононуклеарах крови для четырех генов выявлено изменение метилирования ДНК у пациентов с ААА по сравнению с контрольными образцами: при патологии абдоминальной аорты метилирование ДНК генов *ADCY10P1* и *CNN2* было снижено, а для *KLHL35* и *SERPINK9* – повышено [59]. В срезах интима-медиа ААА, а также в близлежащих неизмененных участках аорты наблюдали разный уровень метилирования CpG-сайтов, расположенных в промоторе гена *SM22 $\alpha$*  (принятое обозначение в настоящее время – *TAGLN* (transgelin)); этот ген кодирует чувствительный к изменению формы и трансформации актин-связывающий белок, значим для поддержания фенотипа гладкомышечных клеток, что влияло на уровень его экспрессии (наблюдалась обратная зависимость экспрессии от метилирования ДНК) и сопровождалось увеличением в пораженных тканях уровня матриксных металлопротеиназ 2 и 9 [62]. При этом, несмотря на то что матриксные протеиназы вовлечены в патогенез АА [65, 66], в клетках венозной крови у мужчин с ААА уровень метилирования промоторов генов *MMP2* и *MMP9* (так же как генов *TIMP2*, *TIMP1*) не отличался от такового в контрольных образцах [63].

Противоречивые данные об изменении интегрального уровня метилирования ДНК у пациентов с ААА получены при исследовании клеток крови: по сравнению с контрольными образцами ДНК у пациентов с ААА была гипометилирована в Т-клетках (CD3+) [20], но гиперметилирована в регуляторных Т-клетках [61] и клетках цельной крови [64]. Возможно, данное противоречие обусловлено различными критериями формирования выборки пациентов (пол, возраст, статус курения, сопутствующие заболевания) и клиническими особенностями основной патологии (например, по диаметру аорты).

В то же время некоторыми исследователями метилирование ДНК в клетках крови рассматривается в качестве фактора риска ААА независимо от статуса курения, приема лекарственных препаратов и наличия серьезных сопутствующих заболеваний [64]. Однако оценки зависимости особенностей клинической картины болезни от статуса метилирования ДНК противоречивы [20, 21]. Для уровня метилирования генов *CNN2*, *SERPINK9* и *ADCY10P1* установлена более тесная связь с наличием АА, чем с такими традиционными

факторами риска как возраст и статус курения, что позволило рассматривать уровень метилирования данных трех генов в качестве самостоятельного аддитивного фактора риска ААА [59].

В целом результаты исследования метилирования ДНК при ТАА и ААА, независимо от того получены они на образцах ткани аорты или на клетках крови, позволяют заключить о происходящих эпигенетических модификациях на уровне метилирования ДНК при развитии патологического процесса.

Следует подчеркнуть, что характер изменения метилирования ДНК в пораженных участках аорты не всегда согласуется с таковыми при исследовании других тканей, участков сосудов или даже близлежащих непораженных участков аорты. Так, Björck Н.М. с соавт. [56] зарегистрировали аорто-специфичные различия по метилированию 39 984 отдельных CpG-сайтов между пациентами с двустворчатым и трехстворчатым аортальным клапаном (с расширенной аортой в обоих случаях), тогда как у тех же пациентов не наблюдали различий по глобальному и среднему уровню метилирования ДНК в комплексе интима-медиа внутренних грудных артерий [56]. Различный статус метилирования ряда CpG-сайтов ранее отмечали и при исследовании других сосудов (в частности, большой подкожной вены, внутренней грудной артерии и коронарных артерий, пораженных атеросклерозом [32]).

У пациентов с расслоением аорты уровень метилирования внеклеточной ДНК для большинства из 50 топ-дифференциально метилированных регионов отличался от такового в образцах ткани восходящей аорты, а для 40% таких регионов изменения метилирования у пациентов по сравнению с контролем (увеличение/снижение) были разнонаправленны для внеклеточной ДНК плазмы крови и ДНК из ткани аорты [33]. Это указывает на проблематичность экстраполяции данных по метилированию ДНК, полученных на других тканях (сосудах другой локализации, клетках крови) на пораженные участки аорты с целью уточнения молекулярных патогенетических событий.

#### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-МЕТИЛИРОВАННЫХ РЕГИОНОВ ДНК ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Оценить функциональную значимость изменения метилирования ДНК при развитии АА можно с использованием различных подходов: во-первых, через анализ биохимических процессов, в которые вовлечены дифференциально метилированные гены; во-вторых, на основании данных о связи статуса метилирования с клинически значимыми при развитии АА признаками (в том числе – с

диаметром аорты как маркером патологического состояния).

Действительно, метилирование ДНК может влиять на уровень экспрессии различных генов, в том числе и генов моногенных форм ТАА и других генов, продукты которых вовлечены в патогенез АА. Так, 434 из 5 000 дифференциально метилированных CpG-сайтов для пар сравнения “расслоение грудной аорты—контроль”, “двустворчатый аортальный клапан—контроль”, “двустворчатый аортальный клапан—расслоение грудной аорты” были связаны с дифференциально экспрессирующимися при данных состояниях генами в тканях аорты [55]. Например, для гена *THSD4* установлены значительные различия как по метилированию (cg14080982 и cg23336695), так и по уровню экспрессии между образцами пациентов с расслоением аорты и контрольными образцами [55]. Shah A.A. с соавт. [53] установили, что выявленные при сравнении образцов тканей аорты от пациентов с двустворчатым и трехстворчатым клапаном дифференциально-метилированные гены (всего — 9 генов) характеризовались также дифференциальной экспрессией. Например, гиперметилированный статус гена *PTPN22* характеризовался сниженной экспрессией у пациентов с двустворчатым клапаном по сравнению с трехстворчатым.

В исследованиях, как правило, наблюдается обратная зависимость между уровнем метилирования ДНК и экспрессией широкого спектра генов. В ткани аорты пациентов с двустворчатым аортальным клапаном и расширенной аортой более 1.5 тыс. генов, ассоциированных с гипометилированными регионами, характеризовались более высоким уровнем экспрессии [56]. В аорте у данных пациентов гены, локализованные в гипометилированных регионах, связаны с эпителиально-мезенхимальным переходом, миогенезом гладких мышц, регуляцией актинового цитоскелета фокальной адгезией, передачей сигналов MAPK и WNT и другими; локализованные в гиперметилированных регионах — с сиквенс-специфичным связыванием ДНК и активностью транскрипционных факторов, контролирующих развитие сердца и гомеостаз сосудов (например, *GATA4*, *Nkx2-5*, *Nkx2-6*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5* и *Isl1*), а также морфогенезом органов и др. Считают, что изменения уровня метилирования ДНК и уровня экспрессии генов, продукты которых значимы для развития сосудов, могут способствовать потере целостности аорты и патогенезу расслоения грудной аорты сердца [33].

Данные по дифференциальной экспрессии для эпигенетически модифицированных генов ТАА наблюдались и в независимых исследованиях [53, 56, 67]. Так, Björck Н.М. с соавт. [56] установили снижение метилирования гена *MYLK* в ткани

аорты у пациентов с двустворчатым по сравнению с пациентами с трехстворчатым аортальным клапаном (как с расширенной, так и нерасширенной аортой) и чувствительность статуса метилирования ДНК к нарушению кровотока, а Doppler С. с соавт. [67] зарегистрировали увеличение экспрессии данного гена у пациентов с ДАК по сравнению с ТАК (с расширенной аортой). Более высокую экспрессию *MYLK*, оцененную на уровне белка, в интиме и среднем слое аорты, наблюдали у пациентов с двустворчатым клапаном по сравнению с трехстворчатым (в обеих выборках — с нерасширенной аортой) [68]. Примечательно, что гипометилирование *MYLK* ассоциировано с активностью кодируемой данным геном киназы легких цепей миозина [56].

В то же время не всегда регистрируют обратную зависимость между уровнем метилирования ДНК и уровнем экспрессии генов или наблюдаются противоречивые результаты [53, 56, 67]. Например, для гена *ACTA2* установили дифференциальное метилирование, но не различия по уровню экспрессии в клетках аорты между пациентами с ТАА с двустворчатым и трехстворчатым клапаном [53]; для гена *FBN1* более низкий уровень и метилирования [56], и экспрессии [67] наблюдали у пациентов с расширенной аортой и двустворчатым аортальным клапаном по сравнению с трехстворчатым. В клетках аорты для двух НОХ-генов (*НОХА5*, *НОХВ6*) зарегистрирована положительная корреляция между уровнем метилирования и экспрессии и для одного (*НОХС6*) — отрицательная [33]. Shah A.A. с соавт. [53] отмечали дифференциальное метилирование для многих генов, участвующих в развитии сердечно-сосудистой системы (в том числе для гена *ACTA2*, патогенные варианты в котором приводят к развитию моногенной формы ТАА), но различий по уровню экспрессии данных генов в клетках аорты не наблюдали. Противоречивость результатов, с одной стороны, может быть следствием высокой клинической гетерогенности ТАА, а с другой, — указывает на многогранность регуляторных процессов реализации генетической программы.

В ряде исследований отмечали зависимость клинических показателей от уровня метилирования ДНК. Так, Toghil В.Ј. с соавт. [21] показали, что в мононуклеарах периферической крови уровень метилирования ДНК положительно коррелирует с диаметром ААА: при диаметре абдоминальной аорты более 55 мм глобальный уровень метилирования ДНК составил 1.86%; при 30–55 мм — 0.93%, тогда как в контроле (диаметр аорты менее 25 мм) — 0.79%. Уровень метилирования ДНК, значительно измененный в Т-клетках пациентов с ААА, отрицательно коррелировал с диаметром абдоминальной аорты [20]. Это, по мнению авторов процитированного исследования, указывает на важную роль активации патологических иммунных реакций при развитии ААА. В то же

время если у пациентов с AAA диаметр аорты отрицательно коррелировал со степенью глобального метилирования ДНК в Т-клетках [20], положительная корреляция между данными параметрами наблюдалась в мононуклеарах [21].

Таким образом, несмотря на то что накапливаются данные, указывающие на значимость метилирования ДНК в развитии АА различной локализации, они не всегда однозначны, а иногда и противоречивы. Такая ситуация может не только быть следствием клинической и этиологической сложности АА, но и отражать сложность и комплексность эпигенетических модификаций на различных уровнях их реализации.

### СВЯЗЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК С ДРУГИМИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИМИ МОДИФИКАЦИЯМИ ПРИ АНЕВРИЗМЕ АОРТЫ

Метилирование ДНК тесно связано с другими эпигенетическими модификациями (модификация гистонов, некодирующие РНК). Действительно, показано, что через измененный статус метилирования ДНК модифицируются и другие эпигенетические процессы, значимые в отношении патогенеза АА [55, 61].

Ran S. с соавт. [55] установили, что у пациентов с двустворчатым клапаном и аневризматической дилатацией грудной аорты наблюдается гиперметилирование мишеней EZH2-каталитической субъединицы комплекса PRC2/EED–EZH2, которая метилирует остатки лизина в положениях 9 и 27 гистона H3 (H3K9me и H3K27me соответственно) и действует как платформа для рекрутирования ДНК-метилтрансфераз (DNMT), что приводит к репрессии транскрипции генов-мишеней. В клетках hESC (данные ChIP-Seq ENCODE) наблюдали сильное обогащение EZH2, SUZ12 (члены комплекса PRC2) и CtBP2 среди гиперметилированных CpG-сайтов при двустворчатом аортальном клапане, но такого обогащения не было выявлено среди гипометилированных CpG-сайтов [55].

Кроме того, выявлена вовлеченность ферментов, участвующих в эпигенетических процессах, в патогенетически значимые в отношении АА события [25, 51, 52]. Уровни мРНК генов ДНК-метилтрансфераз *DNMT1* и *DNMT3A*, а также гистондеацетилаз *HDAC1* и *HDAC5* в Т-регуляторных клетках были выше в группе у пациентов с ААА, чем в контроле [61]. Более высокий уровень этих ДНК-метилтрансфераз также был установлен у человека в ткани аорты при ААА [69]. Показано, что в ГМКС подавление трансляции генов ДНК-метилтрансфераз *DNMT3a* и *DNMT3b* при помощи *miR-29b* увеличивает экспрессию генов *MMP2* и *MMP9* [70, 71], кодирующих матричные

металлопротеиназы, вовлеченные в патогенез АА [72, 73]. Более того, структурные варианты генов ДНК-метилтрансфераз также могут влиять на риск развития АА. Было показано, что rs2114724 гена *DNMT1* ассоциирован с риском развития внутричерепной аневризмы [74].

На мышинной модели зарегистрированы повышение активности гистон-метилтрансферазы EZH2 и репрессия гена *SM22α* в ГМК [13]. При этом у человека уровень экспрессии *SM22α* отрицательно коррелирует с размером ТАА, а у мышей *Fbn1C1039G/+* (модель синдрома Марфана) при дефиците *SM22α* регистрируют индуцированное беременностью расслоение аорты [13]. Эти данные еще раз указывают на зависимость эпигенетических событий от функционального состояния клеток.

Различные эпигенетические события взаимосвязаны и взаимозависимы, что наблюдали у пациентов с АА. Так, не только уровень метилирования ДНК, но и статус модификации гистонов значительно изменены в Т-клетках крови пациентов с АА [20, 61]. Например, в данных клетках у пациентов с ААА, наряду с изменением метилирования ДНК, были выше уровни ацетилирования H3 (в 1.59 раза,  $p < 0.0001$ ) и H3K14 (в 2.15 раза,  $p < 0.0001$ ), чем у здоровых индивидов (несмотря на то что уровень мРНК HDAC1 в 2.33 раза ниже у пациентов, чем в контроле) [20]. Примечательно, что во время образования ААА наблюдаются динамические изменения модификации гистона H3 (показано на модельных животных), и эти изменения могут быть связаны с функционированием специфических молекулярных путей (путь эндоцитоза, фокальной адгезии и др.) [23]. Это позволило авторам предположить патогенетическую значимость данных динамических изменений модификации гистонов H3. Уровни лизин [K] гистоновых ацетилтрансфераз KAT-семейства (GNAT (KAT2A, KAT2B), p300/CBP (KAT3A, KAT3B) и MYST (KAT5, KAT6A, KAT6B, KAT7, KAT8)) были значительно выше в образцах аорты пациентов с ААА, чем в контроле, что сопровождалось изменением ацетилирования соответствующих гистонов [19].

Терапевтические вмешательства на уровне регуляции экспрессии эпигенетических ферментов рассматриваются в качестве перспективных подходов к управлению развитием АА у человека [51, 75]. Так, в качестве многообещающих рассматривался терапевтический подход к преодолению прогрессирования аневризмы на основе использования ингибиторов активности гистондеацетилаз (HDAC), уровень которых повышен при ААА [75], и для ряда генов (*HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC9*, *HDAC10*, *HDAC11*) регистрируют гипометилирование в тканях аорты при условиях, способствующих развитию ТАА (наличие двустворчатого клапана, нарушение кровотока) [56].

Следует также упомянуть об эпигенетических механизмах развития ААА с участием различных регуляторных РНК. Значимость микроРНК и длинных некодирующих РНК в развитии аневризмы аорты активно исследуется [16, 22, 24, 76–79]. Будучи генетически детерминированными, они также могут регулироваться на уровне метилирования ДНК.

Комплексность эпигенетических модификаций является важной составляющей патогенеза АА и может выступать модифицирующим фактором как клинической картины болезней, так и выявляемых связей между отдельными эпигенетическими звеньями и АА.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТАА и ААА — возраст-зависимые этиологически гетерогенные группы патологий со сходным клиническим фенотипом. Лишь для относительно небольшого числа лиц удастся выявить причинные генетические факторы, что указывает на возможную роль эпигенетических факторов в патогенезе АА. Метилирование ДНК — один из ключевых эпигенетических процессов, оказывающих влияние на функционирование генома. В обзоре рассмотрены связь уровня метилирования ДНК с факторами риска АА, статус метилирования ДНК в клетках аорты и крови у пациентов с ТАА и ААА (в том числе с учетом осложненного фенотипа в виде расслоения аорты), приведены данные, указывающие на функциональное и патогенетическое значение метилирования ДНК при данных ортопатиях, а также кратко рассмотрены взаимосвязи метилирования ДНК с другими эпигенетическими процессами.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что среди факторов риска АА есть такие, которые влияют на уровень метилирования ДНК (возраст, курение) или при которых регистрируют изменения метилирования ДНК (атеросклероз, артериальная гипертензия). Механизмы, посредством которых измененный статус метилирования ДНК при патологии (например, при атеросклерозе) влияет на патогенез болезней, включают и значимые для развития АА (в частности, модификации фенотипа ГМКС).

Исследования, посвященные изучению метилирования ДНК при ТАА и ААА, немногочисленны и отличаются высокой гетерогенностью как по критериям формирования выборок для исследования и выбору предмета исследования, так и по методическим подходам. В то же время накопленные к настоящему времени данные позволяют заключить, что при АА различной локализации или возействии/наличии факторов риска данной патологии значительно изменяются профили метилирования ДНК тканей, причем этот процесс происходит не

только в патологическом очаге — клетках аорты, но и в других тканях — клетках артерий различной локализации и крови.

Гены, уровень метилирования которых изменяется при развитии АА, имеют потенциальную патогенетическую значимость в развитии АА. Изменение уровня метилирования ряда CpG-сайтов регистрировали при кандидатном выборе генов для исследования, который применялся в основном для пациентов с ААА. У пациентов с ТАА регистрировались многочисленные изменения метилирования ДНК на уровне генов, а анализ обогащения их белковых продуктов показал вовлеченность в широкий спектр метаболических и клеточных процессов, значимых для патогенеза АА. В частности, отмечались изменения метилирования ДНК генов, участвующих в развитии сердца и сосудов, миогенезе гладких мышц, эпителиально-мезинхимальном переходе, MAPK и WNT/ Wnt/ $\beta$ -catenin сигнальных путях и др. Уровень метилирования ДНК изменялся в генах эластогенеза, гомеостаза коллагена (как синтеза, так и деградации) и гладкомышечного актина — основных структурных компонентов стенки аорты. Кроме локальных дистантные взаимодействия также играют роль в патогенезе аневризмы: так, изменения метилирования ДНК наблюдаются в Т-лимфоцитах (причем в зависимости от их популяции, эти изменения имеют разную направленность) и общем пуле мононуклеарных клеток крови, причем эти изменения коррелируют с диаметром аорты.

В то же время из-за клинической гетерогенности аневризм и различий в подходах по исследованию метилирования ДНК полученные результаты сложно сравнить между собой. В связи с этим важным представляется увеличение количества исследований по изучению профиля метилирования ДНК, а также других эпигенетических модификаций для дополнения и уточнения молекулярных патогенетических событий при аневризме аорты различной локализации.

В целом метилирование ДНК может рассматриваться как значимый компонент эпигенетических модификаций в патогенезе АА различных локализаций.

Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда № 22-25-00701.

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. *Mangum K.D., Farber M.A.* Genetic and epigenetic regulation of abdominal aortic aneurysms // *Clin. Genet.* 2020. V. 97. № 6. P. 815–826. <https://doi.org/10.1111/cge.13705>
2. *Gouveia E Melo R., Silva Duarte G., Lopes A. et al.* Incidence and prevalence of thoracic aortic aneurysms: A systematic review and meta-analysis of population-based studies // *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2022. V. 34. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2021.08.080>
3. *Tomee S.M., Bulder R.M.A., Meijer C.A. et al.* Excess mortality for abdominal aortic aneurysms and the potential of strict implementation of cardiovascular risk management: A multifaceted study integrating meta-analysis, National Registry, and PHAST and TEDY Trial Data // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2023. V. 65. № 3. P. 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2022.11.019>
4. *Isselbacher E.M., Preventza O., Hamilton Black J. 3rd et al.* ACC/AHA Guideline for the diagnosis and management of aortic disease: A report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Practice Guidelines // *Circulation.* 2022. V. 146. № 24. P. e334–e482. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001106>
5. *Ying A.J., Affan E.T.* Abdominal aortic aneurysm screening: A systematic review and meta-analysis of efficacy and cost // *Ann. Vasc. Surg.* 2019. V. 4. P. 298–303.e3. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2018.05.044>
6. *Qian G., Adeyanju O., Olajuyin A., Guo X.* Abdominal aortic aneurysm formation with a focus on vascular smooth muscle cells // *Life (Basel).* 2022. V. 12. № 2. P. 191. <https://doi.org/10.3390/life12020191>
7. *Zhou Z., Cecchi A.C., Prakash S.K., Milewicz D.M.* Risk factors for thoracic aortic dissection // *Genes (Basel).* 2022. V. 13. № 10. <https://doi.org/10.3390/genes13101814>
8. *Gao J., Cao H., Hu G. et al.* The mechanism and therapy of aortic aneurysms // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023. V. 8. № 1. P. 55. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01325-7>
9. *Duarte V.E., Yousefzai R., Singh M.N.* Genetically triggered thoracic aortic disease: Who should be tested? // *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* 2023. V. 19. № 2. P. 24–28. <https://doi.org/10.14797/mdcvj.1218>
10. *van de Luijngaarden K.M., Heijmans D., Maugeri A. et al.* First genetic analysis of aneurysm genes in familial and sporadic abdominal aortic aneurysm // *Hum. Genet.* 2015. V. 134. № 8. P. 881–893. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1567-0>
11. *Gyftopoulos A., Ziganshin B.A., Eleftheriades J.A., Ochoa Chaar C.I.* Comparison of genes associated with thoracic and abdominal aortic aneurysms // *Aorta (Stamford).* 2023. V. 11. № 3. P. 125–134. <https://doi.org/10.1055/s-0043-57266>
12. *Lino Cardenas C.L., Kessinger C.W., Cheng Y. et al.* An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1009. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03394-7>
13. *Lino Cardenas C.L., Kessinger C.W., MacDonald C. et al.* Inhibition of the methyltransferase EZH2 improves aortic performance in experimental thoracic aortic aneurysm // *JCI Insight.* 2018. V. 3. № 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97493>
14. *Portelli S.S., Robertson E.N., Malecki C. et al.* Epigenetic influences on genetically triggered thoracic aortic aneurysm // *Biophys. Rev.* 2018. V. 10. № 5. P. 1241–1256. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0460-1>
15. *Chang Z., Zhao G., Zhao Y. et al.* BAF60a deficiency in vascular smooth muscle cells prevents abdominal aortic aneurysm by reducing inflammation and extracellular matrix degradation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020. V. 40. № 10. P. 2494–2507. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314955>
16. *Tasopoulou K.M., Argiriou C., Tsaroucha A.K., Georgiadis G.S.* Circulating miRNAs as biomarkers for diagnosis, surveillance, and postoperative follow-up of abdominal aortic aneurysms // *Ann. Vasc. Surg.* 2023. V. 93. P. 387–404. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2023.02.029>
17. *Zhang X., Liu S., Weng X. et al.* Brg1 trans-activates endothelium-derived colony stimulating factor to promote calcium chloride induced abdominal aortic aneurysm in mice // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2018. V. 125. P. 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.10.012>
18. *Krishna S.M., Dear A.E., Norman P.E., Golledge J.* Genetic and epigenetic mechanisms and their possible role in abdominal aortic aneurysm // *Atherosclerosis.* 2010. V. 212. № 1. P. 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.008>
19. *Han Y., Tanius F., Reeps C. et al.* Histone acetylation and histone acetyltransferases show significant alterations in human abdominal aortic aneurysm // *Clin. Epigenetics.* 2016. V. 8. P. 3. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0169-6>
20. *Jiang H., Xia Q., Xin S. et al.* Abnormal epigenetic modifications in peripheral T cells from patients with abdominal aortic aneurysm are correlated with disease development // *J. Vasc. Res.* 2015. V. 52. № 6. P. 404–413. <https://doi.org/10.1159/000445771>
21. *Toghill B.J., Saratzis A., Freeman P.J. et al.* SMYD2 promoter DNA methylation is associated with abdominal aortic aneurysm (AAA) and SMYD2 expression in vascular smooth muscle cells // *Clin. Epigenetics.* 2018. V. 1. P. 29. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0460-9>
22. *D'Amico F., Doldo E., Pisano C. et al.* Specific miRNA and gene deregulation characterize the increased

- angiogenic remodeling of thoracic aneurysmatic aortopathy in Marfan syndrome // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 18.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21186886>
23. *Greenway J., Gilreath N., Patel S. et al.* Profiling of histone modifications reveals epigenomic dynamics during abdominal aortic aneurysm formation in mouse models // *Front. Cardiovasc. Med.* 2020. V. 7.  
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.595011>
24. *Mangum K., Gallagher K., Davis F.M.* The role of epigenetic modifications in abdominal aortic aneurysm pathogenesis // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 2.  
<https://doi.org/10.3390/biom12020172>
25. *Rombouts K.B., van Merriënboer T.A.R., Ket J.C.F. et al.* The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections // *Eur. J. Clin. Invest.* 2022. V. 52. № 4.  
<https://doi.org/10.1111/eci.13697>
26. *Eilenberg W., Zagrapan B., Bleichert S. et al.* Histone citrullination as a novel biomarker and target to inhibit progression of abdominal aortic aneurysms // *Transl. Res.* 2021. V. 233. P. 32–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.02.003>
27. *Bararu Bojan Bararu I., Pleșoianu C.E., Badulescu O.V. et al.* Molecular and cellular mechanisms involved in aortic wall aneurysm development // *Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2023. V. 13. V. 2.  
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13020253>
28. *Quintana R.A., Taylor W.R.* Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation // *Circ. Res.* 2019. V. 124. № 4. P. 607–618.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313187>
29. *Mishra S., Raval M., Kachhawaha A.S. et al.* Aging: Epigenetic modifications // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2013. V. 197. P. 171–209.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.02.002>
30. *Wang X., Falkner B., Zhu H. et al.* A genome-wide methylation study on essential hypertension in young African American males // *PLoS OnE.* 2013. V. 8. P. 451.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053938>
31. *Wise I.A., Charchar F.J.* Epigenetic modifications in essential hypertension // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 4.  
<https://doi.org/10.3390/ijms17040451>
32. *Кучер А.Н., Назаренко М.С., Марков А.В. и др.* Вариабельность профилей метилирования CpG-сайтов генов микроРНК в лейкоцитах и тканях сосудов при атеросклерозе у человека // *Биохимия.* 2017. Т. 82. № 6. С. 923–933.)
33. *Liu P., Zhang J., Du D. et al.* Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of Hox genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis // *Clin. Epigenetics.* 2021. V. 13. № 1. P. 124.  
<https://doi.org/10.1186/s13148-021-01110-9>
34. *Dai Y., Chen D., Xu T.* DNA methylation aberrant in atherosclerosis // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13..  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.815977>
35. *Liu S., Li Y., Wei X. et al.* Genetic analysis of DNA methylation in dyslipidemia: a case-control study // *PeerJ.* 2022. V. 10.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.14590>
36. *Chu D.T., Bui N.L., Vu Thi H. et al.* Role of DNA methylation in diabetes and obesity // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2023. V. 197. P. 153–170.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.01.008>
37. *da Silva Rodrigues G., Noronha N.Y., Almeida M.L. et al.* Exercise training modifies the whole blood DNA methylation profile in middle-aged and older women // *J. Appl. Physiol. (1985).* 2023. V. 134. № 3. P. 610–621.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00237.2022>
38. *Krolevets M., Cate V.T., Prochaska J.H. et al.* DNA methylation and cardiovascular disease in humans: a systematic review and database of known CpG methylation sites // *Clin. Epigenetics.* 2023. V. 15. № 1 P. 56.  
<https://doi.org/10.1186/s13148-023-01468-y>
39. *Smolarek I., Wyszko E., Barciszewska A.M. et al.* Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension // *Med. Sci. Monit.* 2010. V. 16. № 3. P. CR149–CR155.
40. *Kato N., Loh M., Takeuchi F. et al.* Trans-ancestry genome-wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. № 11. P. 1282–1293.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3405>
41. *Zhang Y., Mei J., Li J. et al.* DNA Methylation in Atherosclerosis: A new perspective // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2021. V. 2021.  
<https://doi.org/10.1155/2021/6623657>
42. *Chen Y., Liang L., Wu C. et al.* Epigenetic control of vascular smooth muscle cell function in atherosclerosis: A role for DNA methylation // *DNA Cell Biol.* 2022. V. 41. № 9. P. 824–837.  
<https://doi.org/10.1089/dna.2022.0278>
43. *Пальцева Е.М.* Аневризмы аорты: этиология и патоморфология // *Мол. медицина.* 2015. Т. 4. С., 3–10.)
44. *Кучер А.Н., Назаренко М.С.* Роль микро-РНК при атерогенезе // *Кардиология.* 2017. V. 57. № 9. P. 65–76.  
<https://doi.org/10.18087/cardio.2017.9.10022>
45. *Bell C.G., Xia Y., Yuan W. et al.* Novel regional age-associated DNA methylation changes within human common disease-associated loci // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 193.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1051-8>
46. *Balint B., Bernstorff I.G.L., Schwab T., Schäfers H.J.* Age-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells in the normal ascending aorta // *Front. Cardiovasc Med.* 2023. V. 10.  
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1114355>
47. *Wang Z., Zhao J., Sun J. et al.* Sex-dichotomous effects of NOS1AP promoter DNA methylation on intracranial aneurysm and brain arteriovenous malformation //

- Neurosci. Lett. 2016. V. 621. P. 47–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.016>
48. *Fragou D., Pakkidi E., Aschner M. et al.* Smoking and DNA methylation: Correlation of methylation with smoking behavior and association with diseases and fetus development following prenatal exposure // *Food Chem. Toxicol.* 2019. V. 129. P. 312–327.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.059>
  49. *Forte A., Galderisi U., Cipollaro M. et al.* Epigenetic regulation of TGF- $\beta$ 1 signalling in dilative aortopathy of the thoracic ascending aorta // *Clin. Sci. (Lond)*. 2016. V. 130. № 16. P. 1389–1405.  
<https://doi.org/10.1042/CS20160222>
  50. *Davis F.M., Gallagher K.A.* Epigenetic mechanisms in monocytes/macrophages regulate inflammation in cardiometabolic and vascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019. V. 39. № 4. P. 623–634.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312135>
  51. *Davis F.M., Tsoi L.C., Melvin W.J. et al.* Inhibition of macrophage histone demethylase JMJD3 protects against abdominal aortic aneurysms // *J. Exp. Med.* 2021. V. 218. № 6.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20201839>
  52. *Zhao G., Zhao Y., Lu H. et al.* BAF60c prevents abdominal aortic aneurysm formation through epigenetic control of vascular smooth muscle cell homeostasis // *J. Clin. Invest.* 2022. V. 132. № 21.  
<https://doi.org/10.1172/JCI158309>
  53. *Shah A.A., Gregory S.G., Krupp D. et al.* Epigenetic profiling identifies novel genes for ascending aortic aneurysm formation with bicuspid aortic valves // *Heart Surg. Forum.* 2015. V. 18. № 4. P. E134–E139.  
<https://doi.org/10.1532/hcf.1247>
  54. *Matsumura H., Nakano Y., Ochi H. et al.* H558R, a common SCN5A polymorphism, modifies the clinical phenotype of Brugada syndrome by modulating DNA methylation of SCN5A promoters // *J. Biomed. Sci.* 2017. V. 24. № 1. P. 91.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-017-0397-x>
  55. *Pan S., Lai H., Shen Y. et al.* DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve // *Cardiovasc Res.* 2017. V. 113. № 6. P. 692–704.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx050>
  56. *Björck H.M., Du L., Pulignani S. et al.* Altered DNA methylation indicates an oscillatory flow mediated epithelial-to-mesenchymal transition signature in ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 2777.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20642-4>
  57. *Lian R., Zhang G., Yan S. et al.* Identification of molecular regulatory features and markers for acute type A aortic dissection // *Comput. Math. Methods. Med.* 2021. V. 2021.  
<https://doi.org/10.1155/2021/6697848>
  58. *Chen Y., Xu X., Chen Z. et al.* DNA methylation alternation in Stanford A acute aortic dissection // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2022. V. 22. № 1. P. 455.  
<https://doi.org/10.1186/s12872-022-02882-5>
  59. *Ryer E.J., Ronning K.E., Erdman R. et al.* The potential role of DNA methylation in abdominal aortic aneurysms // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 5. P. 11259–11275.  
<https://doi.org/10.3390/ijms160511259>
  60. *Krishna S.M., Seto S.W., Jose R.J. et al.* Wnt signaling pathway inhibitor sclerostin inhibits angiotensin II-induced aortic aneurysm and atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017. V. 37. № 3. P. 553–566.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308723>
  61. *Xia Q., Zhang J., Han Y. et al.* Epigenetic regulation of regulatory T cells in patients with abdominal aortic aneurysm // *FEBS Open Bio.* 2019. V. 9. № 6. P. 1137–1143.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12643>
  62. *Zhong L., He X., Si X. et al.* SM22 $\alpha$  (Smooth Muscle 22 $\alpha$ ) prevents aortic aneurysm formation by inhibiting smooth muscle cell phenotypic switching through suppressing reactive oxygen species/NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019. V. 39. № 1. P. e10–e25.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311917>
  63. *Skorvanova M., Matakova T., Skerenova M. et al.* Methylation of MMP2, TIMP2, MMP9 and TIMP1 in abdominal aortic aneurysm // *Bratisl. Lek. Listy.* 2020. V. 121. № 10. P. 717–721.  
[https://doi.org/10.4149/BLL\\_2020\\_117](https://doi.org/10.4149/BLL_2020_117)
  64. *Vats S., Sundquist K., Wang X. et al.* Associations of global DNA methylation and homocysteine levels with abdominal aortic aneurysm: A cohort study from a population-based screening program in Sweden // *Int. J. Cardiol.* 2020. V. 321. P. 137–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.06.022>
  65. *Simões G., Pereira T., Caseiro A.* Matrix metalloproteinases in vascular pathology // *Microvasc. Res.* 2022. V. 143.  
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2022.104398>
  66. *Stepien K.L., Bajdak-Rusinek K., Fus-Kujawa A. et al.* Role of extracellular matrix and inflammation in abdominal aortic aneurysm // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 19.  
<https://doi.org/10.3390/ijms231911078>
  67. *Doppler C., Messner B., Mimler T. et al.* Noncanonical atherosclerosis as the driving force in tricuspid aortic valve associated aneurysms - A trace collection // *J. Lipid Res.* 2023. V. 64. № 3.  
<https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100338>
  68. *Maleki S., Kjellqvist S., Paloschi V. et al.* Mesenchymal state of intimal cells may explain higher propensity to ascending aortic aneurysm in bicuspid aortic valves // *Sci. Rep.* 2016. V. 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep35712>
  69. *Narayanan N., Tyagi N., Shah A. et al.* Hyperhomocysteinemia during aortic aneurysm: a plausible role of epigenetics // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2013. V. 5. № 1. P. 32–42.
  70. *Takada S., Berezikov E., Choi Y.L. et al.* Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse

- embryos // RNA. 2009. V. 15. P. 1507–1514.  
<https://doi.org/10.1261/rna.1418309>
71. Chen K.C., Wang Y.S., Hu C.Y. et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: A novel mechanism for cardiovascular diseases // FASEB J. 2011. V. 25. № 5. P. 1718–1728.  
<https://doi.org/10.1096/fj.10-174904>
72. Rabkin S.W. The role matrix metalloproteinases in the production of aortic aneurysm // Prog. Mol. Biol. Transl Sci. 2017. V. 147. P. 239–265.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.002>
73. Li T., Jiang B., Li X. et al. Serum matrix metalloproteinase-9 is a valuable biomarker for identification of abdominal and thoracic aortic aneurysm: a case-control study // BMC Cardiovasc. Disord. 2018. V. 18. № 1. P. 202.  
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0931-0>
74. Shafeeqe C.M., Sathyan S., Saradalekshmi K.R. et al. Methylation map genes can be critical in determining the methylome of intracranial aneurysm patients // Epigenomics. 2020. V. 12. № 10. P. 859–871.  
<https://doi.org/10.2217/epi-2019-0280>
75. Galán M., Varona S., Orriols M. et al. Induction of histone deacetylases (HDACs) in human abdominal aortic aneurysm: therapeutic potential of HDAC inhibitors // Dis. Model. Mech. 2016. V. 9. № 5. P. 541–552.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.024513>
76. Iyer V., Rowbotham S., Biros E. et al. A systematic review investigating the association of microRNAs with human abdominal aortic aneurysms // Atherosclerosis. 2017. V. 261. P. 78–89.  
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.010>
77. Li Y., Maegdefessel L. Non-coding RNA contribution to thoracic and abdominal aortic aneurysm disease development and progression // Front. Physiol. 2017. V. 8.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00429>
78. Zalewski D.P., Ruszel K.P., Stepniowski A. et al. Dysregulation of microRNA modulatory network in abdominal aortic aneurysm // J. Clin. Med. 2020. V. 9. № 6. P. 1974.  
<https://doi.org/10.3390/jcm9061974>
79. Xu Y., Yang S., Xue G. The role of long non-coding RNA in abdominal aortic aneurysm // Front. Genet. 2023. V. 14.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2023.115389>

## DNA Methylation in Aortic Aneurysms of Different Localization

A. N. Kucher<sup>a</sup>, S. A. Shipulina<sup>a</sup>, I. A. Goncharova<sup>a</sup>, M. S. Nazarenko<sup>a,\*</sup>

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

\*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Aortic aneurysm (AA) is a life-threatening condition, and aortic rupture that is the complication of AA in the absence of emergency surgery leads to death. Genetic (more often in thoracic AA – TAA) and environmental factors (in TAA and abdominal AA – AAA) contribute to the development of AA. This review summarizes the data of scientific publications devoted to the study of DNA methylation under the influence of AA risk factors, as well as in the cells of different parts of the aorta (thoracic, abdominal) in normal and pathological conditions. Changes in DNA methylation are observed in aortic and/or blood cells in the presence of AA risk factors (arterial hypertension, smoking, age, presence of comorbidities). Studies of DNA methylation in TAA and AAA are few and have been conducted using different approaches to sample formation, cell sample selection, and experimental methods. However, they provide convincing evidence of the altered DNA methylation status of genes selected for study using a candidate approach (in the AAA study), as well as of different genomic regions in genome-wide DNA methylation analysis (mainly in TAA studies). Genes localized in differentially methylated regions are associated with the functioning of the cardiovascular system and are involved in cellular and metabolic processes pathogenetically significant for the development of AA. In a number of cases, the association of DNA methylation levels with clinical parameters in AA has been established. These results indicate the prospect of expanding the studies of DNA methylation in AA, including the identification of new pathogenetically significant links in AA development.

**Keywords:** aortic aneurysm, thoracic aorta, abdominal aorta, DNA methylation, epigenetics, epigenetic modifications.

УДК 575.113

## **L31-ТРАНСПОЗОНЫ ШЕСТИЛУЧЕВЫХ КОРАЛЛОВ (Hexacorallia): РАСПРОСТРАНЕНИЕ, РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ**

© 2024 г. Л. В. Пузакова<sup>1</sup>, М. В. Пузаков<sup>1</sup> \*, П. М. Пузакова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского” Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

<sup>2</sup>Филиал Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в г. Севастополе, Севастополь, 299001 Россия

\*e-mail: puzakov.mikh@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.11.2023 г.

После доработки 23.12.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) эукариот – ретротранспозоны и ДНК-транспозоны – это нуклеотидные последовательности, способные перемещаться из локуса в локус генома, а также между геномами различных организмов. ДНК-транспозоны *L31* являются древней и разнообразной группой, входящей в большую группу *IS630/Tc1/mariner*. *L31*-транспозоны не получили широкого распространения и присутствуют у ограниченного числа таксонов. Помимо последовательности, кодирующей DDE/D-транспозазу, *L31*-транспозоны несут еще одну ОРС (ОРС2). Детальный анализ элементов *L31* в геномах шестилучевых кораллов позволил получить подробную информацию о распространении, разнообразии и структуре элементов. Были выявлены две большие группы, *L31-duo* и *L31-uno*, отличающиеся и по паттерну каталитического домена и по структуре. В результате реконструкции эволюции *L31*-транспозонов было предположено, что шестилучевые кораллы получили *L31*-транспозоны от двустворчатых моллюсков. При этом вышеперечисленная группа *L31-uno*, возможно, была получена моллюсками в результате горизонтального переноса уже от кораллов. Исследования распространения и разнообразия МГЭ у морских беспозвоночных будут способствовать лучшему пониманию процессов эволюции МГЭ и их роли в эволюционной истории видов.

**Ключевые слова:** ДНК-транспозоны, *L31*-транспозоны, коралловые полипы, эволюция геномов, биоразнообразие.

**DOI:** 10.31857/S0016675824060027 **EDN:** BYEJMV

Мобильные генетические элементы (МГЭ) эукариот – ретротранспозоны и ДНК-транспозоны – это нуклеотидные последовательности, структура которых обеспечивает возможность их перемещений из локуса в локус генома, и даже между геномами различных организмов [1, 2]. Функциональные ретротранспозоны несут гены, кодирующие ферменты, которые обеспечивают создание РНК-копии МГЭ (посредника) и последующий синтез комплементарной ДНК и ее интеграцию в геном. Такой механизм перемещения принято называть “копирование–вставка”. Ретротранспозоны можно разделить на три основных подкласса в соответствии с их механизмом репликации и интеграции: 1) элементы с длинными концевыми повторами (*LTR*), 2) элементы без длинных концевых повторов (*non-LTR*) и 3) элементы, использующие тирозин-рекомбиназу (*YR*) [1–4].

ДНК-транспозоны не создают себе копии-посредника и вырезаются из прежнего локуса геномной последовательности и встраиваются в новый. Такой способ перемещения называется (но не для всех МГЭ этого класса) “вырезание–вставка”. В настоящее время известно о четырех основных группах ДНК-транспозонов: 1) элементы, использующие DDE/D-транспозазу (DDE/D-транспозоны), 2) элементы, использующие тирозин-рекомбиназу (*Cryptons*), 3) элементы “катышегося круга” (*Helitrons*) и 4) “самосинтезирующие” транспозоны (*Mavericks* или *Polintons*) [1–4].

DDE/D-транспозоны являются широко распространенными и наиболее разнообразными из всех МГЭ [2]. Они включают в себя около двух десятков надсемейств [4–10]. Распространение этой группы МГЭ достигло таких масштабов, что ген DDE/D-транспозазы является претендентом на

титул самого старого и наиболее распространеного гена на земле [11]. Надсемейство DDE/D-транспозонов *L31* является достаточно древней и разнообразной группой, входящей в объединение надсемейств (инфракласс) *IS630/Tc1/mariner* [9]. Первые представители надсемейства *L31* DDE/D-транспозонов были выявлены при исследовании генома тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* [12]. Было установлено, что *L31*-транспозоны не получили широкого распространения и присутствуют только у двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) и шестилучевых кораллов (*Hexacorallia*). Впоследствии появились данные, что *L31*-транспозоны присутствуют еще и у представителей нематод (*Nematoda*) [13]. Детальный анализ геномов двустворчатых моллюсков показал, что *L31*-транспозоны имеются только в подклассе *Autobranchia*, с преобладанием по количеству и разнообразию в инфраклассе *Pteriomorpha* [9]. В надсемействе транспозонов *L31* моллюсков было выделено пять филогенетических кластеров, включающих в себя элементы со значительными вариациями в структуре.

Элементы *L31*, как и все DDE/D-транспозоны, имеют концевые инвертированные повторы (КИП) и открытую рамку считывания (ОПС), кодирующую фермент транспозазу (рис 1). Транспозаза содержит ДНК-связывающий (PAIRED) и каталитический (DDE/D) домены. Домен PAIRED представлен двумя триадами  $\alpha$ -спиралей, расположенными в первой половине аминокислотной последовательности и между которыми имеется GRPR-подобный мотив (так называемый ТА-крюк). Во второй половине последовательности транспозазы локализован DDE/D-домен, паттерн которого является одной из классификационных черт DDE/D-транспозонов и отвечает за разрезание и перемещение цепей ДНК в процессе внедрения. Этот домен имеет три характерных аминокислотных остатка – два аспартата (D) и один глутамат (E) или аспаргат (D) в качестве третьего, отсюда и название этой триады – мотив или домен DDE/D. На основе различного количества аминокислотных остатков между вторым аспаргатом и третьим глутаматом/аспаргатом в доменах DDE/D суперсемейство *IS630/Tc1/mariner* классифицируется на группы. В частности, *L31*-транспозоны имеют паттерн DD37E. Домен PAIRED связывается с КИП, ТА-крюк опосредует связывание домена PAIRED с ДНК-мишенью, а DDE/D-домен, обладающий эндонуклеазной и лигирующей активностью, обеспечивает как эксцизии, так и инсерции элемента [14, 15]. *L31*-транспозоны несут еще одну ОПС (ОПС2), что встречается достаточно редко у DDE/D-транспозонов [16–19]. Среди предполагаемых функций белка ОПС2 рассматривались такие, как возможность участия в регуляции транскрипции транспозазы или в обеспечении транспорта транспозазы через ядерный поровый комплекс или даже в

транспорте нуклеотидной последовательности самого *L31*-транспозона через клеточную мембрану [9].

Исследование представленности МГЭ у различных таксонов способствует большему пониманию как молекулярной эволюции геномов, так и эволюционной истории видов. Данная работа посвящена изучению элементов надсемейства *L31* у шестилучевых кораллов. *L31*-транспозоны были обнаружены только в двух исследованных отрядах – *Actiniaria* и *Scleractinia* подкласса *Hexacorallia*, однако внутри этих таксонов данная группа представлена множеством филогенетических групп.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Поиск последовательностей *L31*-транспозонов

Для поиска *L31*-транспозонов применяли *tblastn* со стандартными настройками (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [20]. В качестве образца использовали аминокислотные последовательности транспозазы и белка ОПС2 (доп. материалы 1), входящих в структуру элемента *Mariner-31\_CGi* устрицы *Crassostrea gigas*. Полногеномные нуклеотидные последовательности шестилучевых кораллов были взяты из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>). Поиск полноразмерных МГЭ осуществляли на основе гомологии к образцу. Последовательности с процентом соответствия образцу по длине (Query Coverage) ниже 45 при анализе исключались. На следующем этапе учитывали только последовательности, длина транспозазы которых превышала 266 а.о. Затем выбирали последовательности, наиболее протяженные и с наибольшим сходством. Отобранные гомологичные образцу последовательности были взяты вместе с фланкирующими зонами с общей протяженностью 3000 пн.

Если сходство (по результатам анализа в *blastn*) между нуклеотидными последовательностями выбранных гомологичных фрагментов было ниже 65% при значении статистического параметра *E* более  $1e-20$ , то такие фрагменты (элементы) называли уникальными. Копиями уникального элемента считали фрагменты, идентичность нуклеотидной последовательности с последовательностью уникального элемента которых была 65% и выше при значении статистического параметра *E* равного  $1e-20$  и меньше. При оценке количества копий учитывались только элементы, протяженность которых выше 10% от полноразмерного *L31*-транспозона. Для поиска условно потенциально-функциональных транспозаз для каждого обнаруженного элемента мы брали в качестве образца аминокислотную последовательность

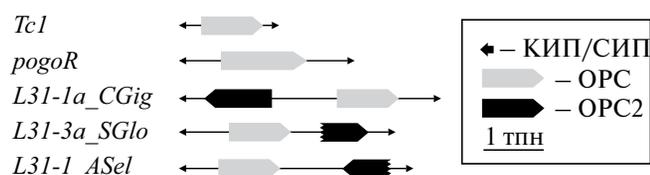
неповрежденной транспозазы этого элемента и осуществляли поиск в *tblastn* с настройками фильтров: Query Coverage 99–100 и Percent Identity 90–100. Среди результатов поиска при подсчете учитывали только те транспозазы, идентичность которых составляет не менее 90%, а соответствие образцу по длине не менее 99% (Query Coverage), с неповрежденной ОРС со стартовым кодоном и стоп-кодоном.

#### Анализ структуры последовательностей

КИП обнаруживали с помощью *blastn* путем анализа нуклеотидных последовательностей [20]. Границы гипотетических ОРС определяли с помощью ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) и далее уточняли визуально. Для анализа доменной структуры последовательностей выборочно было взято по три элемента из каждого кластера (L31-1 – L31-9). Для анализа выбирали условно потенциально-функциональные элементы. Расположение GRPR-подобного мотива и маркерных аминокислотных оснований: аспартат (D), аспаргат (D) и глутамат (E) каталитического домена идентифицировали визуально по гомологии. ДНК-связывающий домен PAIRED выявляли, анализируя вторичную структуру транспозазы, предсказанную с помощью программы PSIPRED v4.0 [21]. Последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) определяли с помощью программы PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>). Графическое представление обобщенных последовательностей фрагмента области второго аспартата каталитического домена было сгенерировано с помощью WebLogo [22].

#### Филогенетический анализ

Филогенетическое дерево было рассчитано с использованием метода максимального



**Рис. 1.** Структура транспозонов суперсемейства *L31*. 1 тпн – 1000 пн; КИП/СИП – концевые инвертированные повторы или субконцевые инвертированные повторы; ОРС – открытая рамка считывания, кодирующая транспозазу; ОРС2 – открытая рамка считывания, кодирующая белок с неизвестной функцией.

правдоподобия в программе IQ-TREE [Nguyen L.T., 2015] со сверхбыстрым бутстреп-анализом (UFBoot) (1000 повторов) [23], а модель LG+F+I+G4 была выбрана с помощью ModelFinder [24]. Множественное выравнивание было выполнено с помощью MAFFT с применением метода G-INS-I [25]. В филогенетический анализ были включены все выявленные элементы кораллов, *L31*-транспозазоны моллюсков, обнаруженные ранее [9], а также представители надсемейств *Gambol*, *pogo*, *Tc1/mariner*, *Sailor*, *HvSm*, *Tec*, *TBE* и в качестве внешней группы – элементы *IS630*. (доп. материалы 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Представленность *L31*-транспозонов у шестилучевых кораллов

В ходе исследования были изучены полногеномные последовательности стрекающих подкласса Hexacorallia. Из пяти отрядов шестилучевых кораллов (*Actiniaria*, *Antipatharia*, *Coelomorpharia*, *Scleractinia*, *Zoantharia*) в геномных коллекциях NCBI были представлены (на июль 2022 г.) только два – *Actiniaria* и *Scleractinia*. Были изучены 12 видов (6 семейств) отряда *Actiniaria* и 30 видов (7 семейств) – *Scleractinia* (доп. материалы 2). Элементы надсемейства *L31* были обнаружены во всех исследованных сборках, однако у трех видов *Nematostella vectensis* (*Actiniaria*), *Stylophora pistillata* и *Orbicella faveolata* (*Scleractinia*) были обнаружены лишь короткие фрагменты (доп. материалы 2), наличие которых оценивалось как отсутствие (утрата) элемента. Всего было описано 172 уникальных *L31*-транспозона, при этом количество уникальных элементов у видов варьировало от нуля (*Nematostella vectensis*, *Stylophora pistillata*, *Orbicella faveolata*) до семи (*Diadumene lineata*, *Acropora microphthalma*, *Acr. yongei*, *Montipora efflorescens*) (доп. материалы 2). Количество копий каждого уникального *L31*-транспозона было невысоким и превышало 20 лишь в нескольких случаях: *L31-4\_EPal* (29), *L31-2\_PSpe* (24), *L31-1\_MCap* (24), *L31-4\_MCac* (26) и *L31-4\_CGra* (31). У двух элементов количество копий превысило 40 – *L31-6\_AYon* (43) и *L31-5\_DLin* (49), а у *L31-5\_CGra* достигло 96 (доп. материалы 2).

#### Разнообразие *L31*-транспозонов стрекающих

Для оценки разнообразия *L31*-транспозонов был проведен филогенетический анализ, в который были включены все выявленные элементы кораллов, представители надсемейства *L31* моллюсков, обнаруженные ранее [9], а также представители надсемейств *Gambol*, *pogo*, *Tc1/mariner*, *Sailor*, *HvSm*, *Tec*, *TBE* и в качестве внешней группы

— элементы *IS630* (доп. материалы 1). Преобладающее большинство изучаемых элементов стрекающих сформировало единую кладу с *L31*-транспозонами моллюсков (рис. 2). Однако внутри сформировались две ярко выраженные подгруппы. Первая (названная *L31-duo*) включала элементы с паттерном каталитического домена транспозазы DD37E, вторая (названная *L31-uno*) объединяла транспозазы с паттерном DD38E. Обе подгруппы включали элементы и кораллов, и моллюсков. Практически все элементы группы *L31-duo* имели фрагменты OPC2, тогда как из 39 элементов *L31-uno* только

*L31-5\_DLin* имел фрагмент OPC2. Три элемента стрекающих с паттерном DD34E сформировали отдельную кладу (*L31-like*), далекую от остальных *L31*-транспозонов (рис. 2). Эти элементы, также как и *L31-uno* (за одним исключением), не имели OPC2. С классификацией и принадлежностью данных элементов предстоит разобраться в последующих исследованиях.

На основании филогенетического анализа, а также различий в консервативных локусах аминокислотной последовательности транспозаз среди

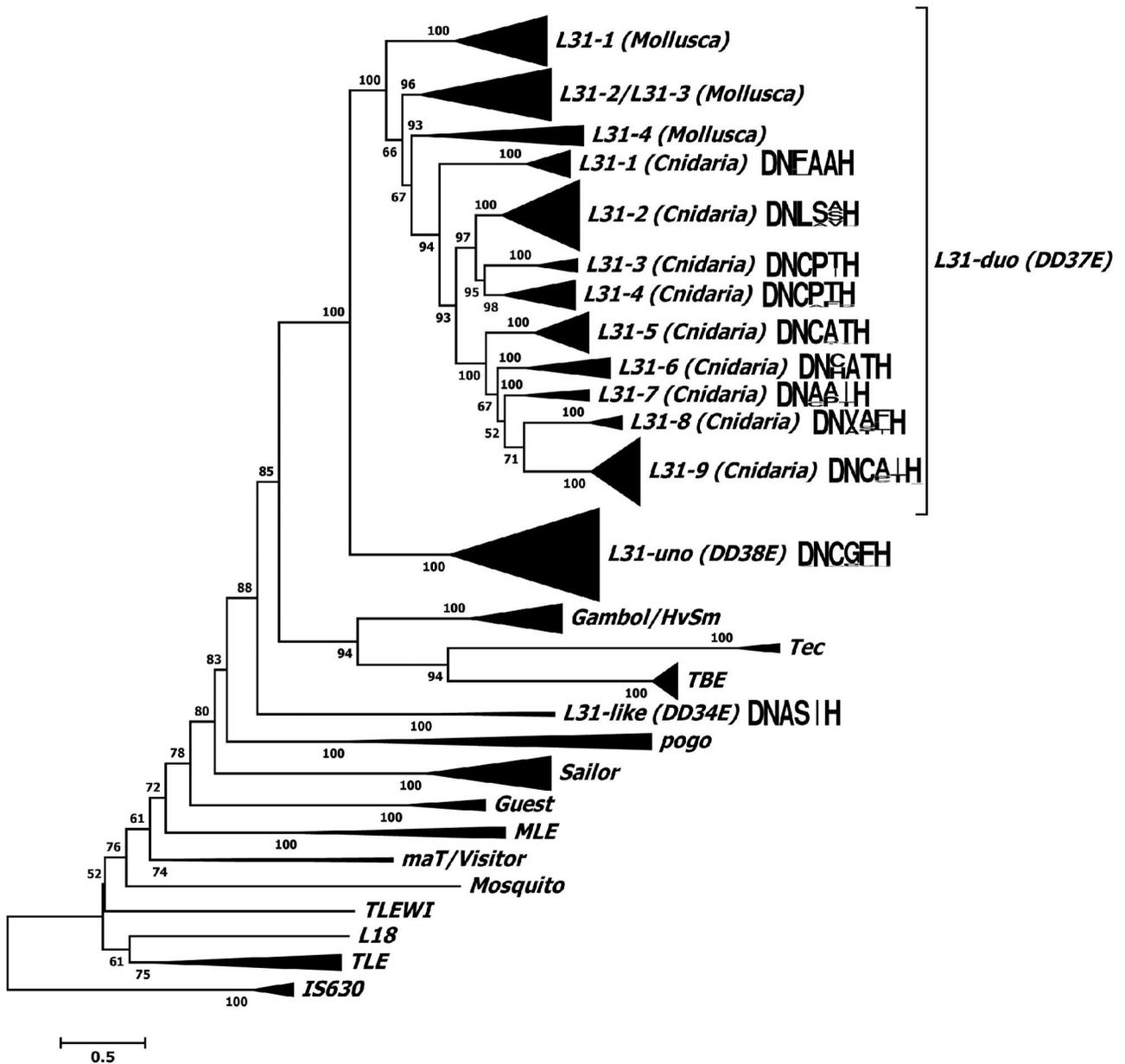


Рис. 2. Филогенетическое разнообразие *L31*-транспозонов. Графическое представление обобщенных последовательностей фрагмента области второго аспартата каталитического домена транспозазы шестилучевых кораллов указаны справа от дендрограммы. Бутстреп-значения менее 50% на дендрограмме не указаны.

L31-2 AMur --MSKVNKCGRTYNPGEAIGESLRSASIDRMLLDGGDPATGFFGGFRKNIIGDCEGVSAPFVSKLWKTFCIQGDHMPQ-KRSSGNPSHLKPEDVQVLEFLKKEKESATLAS  
L31-2 AEch --MSKVNKCGRTYNPGEAIGESLRSASIDRMLLDGGDPATGFFGGFRKNIIGDCEGVSAPFVSKLWKTFCIQGDHMPQ-KRSSGNPSHLKPEDVQVLEFLKKEKESATLAS  
L31-2 PSin --MAYSVNKRGRSLIRGKALIDBSLRGSLIDSLIDEGDDPASGFFPGYRSDVADRFRVSNQFVSKLWQNFCTTIGHLSYR-KKKSGNPSHLKPEDVQVLEFLKKEKESATLPIYKKS  
L31-3 ATene -----MNVYGRFTNQKGTGSDLLKSLIIDELIRGGDDVSTGYFAGSFRITIGSRKXISGVAVSKIWQTPCFCRXLGFLFL-HPVRGHLKLEEPDLDLILMILKSRFSITTYKE  
L31-1 AEQu -----MNVYGRAYNQKGTGSDLLKSLIIDELIRGGDDVSTGYFAGSFRITIGSRKXISGVAVSKIWQTPCFCRXLGFLFL-HPVRGHLKLEEPDLDLILMILKSRFSITTYKE  
L31-1 PCru -----MINTYGRFTNQKGTGSDLLKSLIIDELIRGGDDVSTGYFAGSFRITIGSRKXISGVAVSKIWQTPCFCRXLGFLFL-HPVRGHLKLEEPDLDLILMILKSRFSITTYKE  
L31-2 Avir ---MEVNSFGRTYARGKVLPEDEFRSLIIDELIRGGDDVSTGYFAGSFRITIGSRKXISGVAVSKIWQTPCFCRXLGFLFL-HPVRGHLKLEEPDLDLILMILKSRFSITTYKE  
L31-2 CJar ---MAHMSMAGRVYERKALNEDLDRNLIQDVEKGGDLVTGFFPGSEBENIARTIKLNRTYVKKVWKTFCSTGDFKRP KPSGSSGVKHLQPDVQVLEFLKKEKESATLPIYKKS  
L31-3 CGra ---MAEATSKRGRCYINGRQLQDLDRRKLIVEDIVDGGDVTGFFPGNSATAEARNRVKFDVTRKIKWKEVVRKGDTEIT-KTRAAAGVXHIQODDIDTRFLKIDRASMTAGE  
L31-3 EPal ---MIVTKKGRTFHRGKSLGFDVVRTAVDHDMSKGGDVTXHPFGSFRVAVHFKVSKTVKKTWRQCEATADIVQ-WKGGNPPHQLQSHHLDFTIGLKITIKPSPMPYSK  
L31-1 PSpe ---MNYCVSKKGRILVPGRAIDADFRRLVIDHMSKGGDVTGFFPGSFRVAVHFKVSKTVKKTWRQCEATADIVQ-WKGGNPPHQLQSHHLDFTIGLKITIKPSPMPYSK  
L31-4 HMag ---MLSAKGRFTFNGKALDEDRSLNIIIDSVKGGDHTIGGFFAGNSQIGKNYVSGQTIKVKWKTFCQDGEIIPRDKKSGNPSHLTLEFLEFLVLRKSSPSPMPYK  
L31-1 SMer ---MAAFNLGRYIERGKCLNHDHIGDIDVFIITNGDSDHTIGGFFPGNSATAEARNRVKFDVTRKIKWKEVVRKGDTEIT-KTRAAAGVXHIQODDIDTRFLKIDRASMTAGE  
L31-1 AMyr ---MAFNEKGRFYERGGKLSBEFGQIIDKILETGGDRISGYPFAKTELGDGKFGVSGKTAKNVWQKFPVMDGTVSPK-KRISGNPPKLSFGDLQIETMKTIKPSTSSKN  
L31-1 AHya ---MAFNKGRFYERGGKLSBEELGQIVDKILETGGDRISGYPFAKTELGDGKFGVSGKTAKNVWQKFPVMDGTVSPK-KRISGNPPKLSFGDLQIETMKTIKPSTSSKN  
L31-5 EPal ---MINTYGRFTNQKGTGSDLLKSLIIDELIRGGDDVSTGYFAGSFRITIGSRKXISGVAVSKIWQTPCFCRXLGFLFL-HPVRGHLKLEEPDLDLILMILKSRFSITTYKE  
L31-3 AYon ---MKLNASGRTYVGRKSLADDERESLIIIDELIRGGDDVSTGYFAGSFRITIGSRKXISGVAVSKIWQTPCFCRXLGFLFL-HPVRGHLKLEEPDLDLILMILKSRFSITTYKE  
L31-4 ATene ---MAVNSQGRVYERKALNEDLDRNLIQDVEKGGDLVTGFFPGSEBENIARTIKLNRTYVKKVWKTFCSTGDFKRP KPSGSSGVKHLQPDVQVLEFLKKEKESATLPIYKKS  
L31-1 MCap MEARKVNOGFRSYPGVALAQDLKFLIIDSLIRGGDRTIGYIPRSVTFQARELRVSNVTVKSVWFRYCEBMITTPK-PKGLTFEKLKEDDREILVBLKILHSPMSLSSE  
L31-1 AMic MEALKVNKGRTYRGTGIALDQMRSLIIDRILQEGGDRVTGYIPRSVTFQARELRVSNVTVKSVWFRYCEBMITTPK-PKGLTFEKLKEDDREILVBLKILHSPMSLSSE  
L31-4 MCac MEALKVNKGRTYRGTGIALDQMRSLIIDRILQEGGDRVTGYIPRSVTFQARELRVSNVTVKSVWFRYCEBMITTPK-PKGLTFEKLKEDDREILVBLKILHSPMSLSSE  
L31-3 DLin ---MFKVSKKGRTYRGTGIALDQMRSLIIDRILQEGGDRVTGYIPRSVTFQARELRVSNVTVKSVWFRYCEBMITTPK-PKGLTFEKLKEDDREILVBLKILHSPMSLSSE  
L31-5 ACyt ---MLTVNSQGRVYERKALNEDLDRNLIQDVEKGGDLVTGFFPGSEBENIARTIKLNRTYVKKVWKTFCSTGDFKRP KPSGSSGVKHLQPDVQVLEFLKKEKESATLPIYKKS  
L31-1 AAwi ---MLTVNSQGRVYERKALNEDLDRNLIQDVEKGGDLVTGFFPGSEBENIARTIKLNRTYVKKVWKTFCSTGDFKRP KPSGSSGVKHLQPDVQVLEFLKKEKESATLPIYKKS  
L31-3 AInt ---MFSINKYGRNFKPGIPLSDMLRNEVIQMAATR-----PISIEICERYRINRSTVHKYTKQVRETNIEPLSRKHIRTRSKLSFGDSMLLEITVQGGKSTSLKE  
L31-6 AYon ---MFSINKYGRNFKPGIPLSDMLRNEVIQMAATR-----PISIEICERYRINRSTVHKYTKQVRETNIEPLSRKHIRTRSKLSFGDSMLLEITVQGGKSTSLKE  
L31-1 PAus ---MFSINKYGRNFKPGIPLSDMLRNOV-----KELAQDY---CFSEVGRRIIRISKGSVSKIWKQNLGTGAPKLNHVRVTPKCTFODSILLETMVQARGSSSLKE

L31-2 AMur IKETVENYCNLNGG-TLSAIGNTVRNRLPDG-PTRKKLTRPKAEKFTPNQNLAYCGQFLNFISALPPEKIKFFDEAGVN-SGTGNPVYSSSLKGTGKSEIAEA-IPRGNV  
L31-2 AEch IKETVENYCNLNGG-TLSAIGNTVRNRLPDG-PTRKKLTRPKAEKFTPNQNLAYCGQFLNFISALPPEKIKFFDEAGVN-SGTGNPVYSSSLKGTGKSEIAEA-IPRGNV  
L31-2 PSin IKREVLNYSGLDGG-TLSAIGNTVRNRLPDG-PTRKKLTRPKAEKFTPNQNLAYCGQFLNFISALPPEKIKFFDEAGVH-TGTGNPVYSSSLKGTGKSEIAEA-IPRGNV  
L31-3 ATene IKENVDHAPT--AE-VSISTIGRAAREHLEPEG-KMSWKKVIRPAAEKFSFNDIAHCQSYINFMSTEDPYRVKFFDEAGFELPDACANPKYGHVSIPTPCVEMVR-NQPTN  
L31-1 AEQu IKENVDHAPT--AG-VSISTIGRAAREHLEPEG-KMSWKKVIRPAAEKFSFNDIAHCQSYINFMSTEDPYRVKFFDEAGFELPDACANPKYGHVSIPTPCVEMVR-NQPTN  
L31-1 PCru IKENVDHAGSN--AR-VSITIGRAAREHLEPEG-QMTWKKMVRPAAEKFTPDNIAHCQSYINFMSTEDPYRVKFFDEAGFELPDACANPKYGHVSIPTPCVEMVR-NQPTN  
L31-2 Avir LKKNVNFPCQLPTG-TSQAQANRNVRNLCMGGG-KWLSKRMVRSAPAEKFTHENIQYQDQDFIDYISSVDPHLKFDEAGFKLDPANRYGHSLVGTPCVEMVR-NAQSPN  
L31-2 CJar VRYVYVNFPCVACG-TSNAATQRAIRNHI.TDG-SWTWKRTIQPVAPKFPSPNVHYCQFPVNYITVDPYKIKFFDEAGFKLDPANRYGHSLVGTPCVEMVR-NMNSPN  
L31-3 CGra LYKHNLQGNICIAAG-TSNAATARRVLRNNTDTC-KWTWKRLTRVTEKFTPDNINCYQGVVNYISTVDPYKIKFFDEAGFKLDPANRYGHSLVGTPCVEMVR-YATSPN  
L31-1 EPal IHEAVNHHCPPIAG-TSRSISGKAVQNRILQGG-RWTKWKRMSRNVHKKFTPANVYQDFELNYMNTIDPYRIKYDFDEAGFELPDACANPKYGHVSIPTPCVEMVR-YHNAFN  
L31-1 PSpe IREVINANCAIPSG-TSISAIGRAVQRRLSGG-PWTWKRMTFKYKFTPENANRYQDFLSYISSVDPHLKFDEAGFALPGVKANYGHSRANHPCVEIGR-HLGAPN  
L31-4 HMag HVDAVSYCNVIGN-TSQAIGRAVRRKMPSG-PMSKRTSNRPTNKLQENIDYQDFELNYMNTIDPYRIKYDFDEAGFALPGVKANYGHSRANHPCVEIGR-NIDTPN  
L31-1 SMer LLSHVYQGNLQGTG-TSISAIGRTRVNSLIDG-SWSKWRMSRNVHKKFTPANVYQDFELNYMNTIDPYRIKYDFDEAGFALPGVKANYGHSRANHPCVEIGR-YLKSFN  
L31-1 AMyr IREQQLQHGNLQGTG-TSISAIGRTRVNSLIDG-SWSKWRMSRNVHKKFTPANVYQDFELNYMNTIDPYRIKYDFDEAGFALPGVKANYGHSRANHPCVEIGR-HLKSFN  
L31-1 AHya IREQQLQHGNLQGTG-TSISAIGRTRVNSLIDG-SWSKWRMSRNVHKKFTPANVYQDFELNYMNTIDPYRIKYDFDEAGFALPGVKANYGHSRANHPCVEIGR-HLKSFN  
L31-5 EPal IHEKLEEFNGIPNG-TSISASRALKGRMLSGKQYSRKKVSPIAQERFTVENMAYTQLFIDYLYSKDFPKLKFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHQSPN  
L31-3 AYon IHDVLENEFDIPNG-TSISAISRRLRNMLSGLYSRKXISFAQERFTVENMAYTQIFIDDLHAKNPYKLFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-4 ATene LLENELOQGNIGG-TSISAISKALCERMPGKAYSRKXISYVAEERFTANMAYTQIFIDDLHAKNPYKLFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-1 MCap IIMELEQLG--GQEISMAVSRAIKLPSFGDQYSRKXISYVAEERFTANMAYTQIFIDDLHAKNPYKLFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-1 AMic IISOLEEMD--GEEVSMATVSRALKHRLPSG-PYTRKKITKIALERFTQNTFYTQIFIDDLHAKNPYKLFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-4 MCac ILENNLYPCGLYVYGSYSSVGRVSNLPSG-KFSYKXITKIAQERFTQNLAYTQVFDVYLYKDFPKLKFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-5 ACyt VMDCLYQGLDPLPGTTSVAVONAVRNLPSGKGFTRKXIAHVAQERFTANMAYTQIFIDDLHAKNPYKLFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-1 AAwi VMDCLYQGLDPLPGTTSVAVONAVRNLPSGKGFTRKXIAHVAQERFTANMAYTQIFIDDLHAKNPYKLFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YHESPN  
L31-3 AInt IKSELSNFGD--CGELSLSTLSRHRVKNLPSGKDYSRKRLGKAGERFTHENLVYQDFLDYLYSKDPSAVKFFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YLSTAN  
L31-6 AYon MKSELSNFGD--CGELSLSTLSRHRVKNLPSGKDYSRKRLGKAGERFTHENLVYQDFLDYLYSKDPSAVKFFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YLSTAN  
L31-1 PAus LRDDLAIHGD--CGELSLSTLSRHRVKNLPSGKDYSRKRLGKAGERFTHENLVYQDFLDYLYSKDPSAVKFFDEAGFKLTPSHGKRLYGHSPVGERCFVEMR-YLSTAN

L31-2 AMur ITLNLVLGLEGILYANTLDGASNSFTFLNFFGAEQAQTSAL-GNPAIEQGDGFIIMDNCAIHRFEAGTALQWLMDMGANVITYPSPSPEFNVAEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-2 AEch ITLNLVLGLEGILYANTLDGASNSFTFLNFFGAEQAQTSAL-GNPAIEQGDGFIIMDNCAIHRFEAGTALQWLMDMGANVITYPSPSPEFNVAEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-2 PSin VTLSSLCLLEGVLYANTVEGASDINFLNFFAEAGRVTTAL-GNPAIEFGDYIILDNCPHRYDTGNILQWLLQMQAQIITYPSPSPEFNVAEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-3 ATene VTLNLLCGRGMIMYANTLREASNTVEFLNFFYEAASQFTQPD-GNSILEYGYIIVVDNVAPHRFDGGEILTEWLDSEFGMTLILYLPVYSSSELNPELVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 AEQu VTLNLLCGRGMIMYANTLREASNTVEFLNFFYEAASQFTQPD-GNSILEYGYIIVVDNVAPHRFDGGEILTEWLDSEFGMTLILYLPVYSSSELNPELVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 PCru VTLNLLCGRGMIMYANTLREASNTVEFLNFFYEAASQFTQPD-GNSILEYGYIIVVDNVAPHRFDGGEILTEWLDSEFGMTLILYLPVYSSSELNPELVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-2 Avir ITLNLMLCGLDGIYANTINGTSNSMTFLNFFEEAASHVFLPD-GRPPYIYGDHIIIMDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-3 CGra ITLNLMLCGLDGIYANTINGTSNSMTFLNFFEEAASHVFLPD-GRPPYIYGDHIIIMDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-3 EPal VTLNLLGLDGVYANTEDGASNTLEFLNFFGAEASNSRIPS-GFPALQYDVIDVLDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 PSpe VTLNMLIGLEGVYANTEDGATDLEFLNFFGAEASNSMNP-GQPLQYGDVIDVLDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-4 HMag VITLMLYAGMEVMAFANTIDGATDLEFLNFFGAEASNSFLRN-GEPLVYGDHIIIMDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 SMer ATLNLVLGDLGVYANTLDGASNTLEFLNFFDEASKNFQRN-GNPILMAGDIIIMDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 AMyr ITLNLFLAGLEGVYANTLDGASNTLEFLNFFDEATKATQIN-GNPVLMAGDIIIMDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 AHya ITLNLFLAGLEGVYANTLDGASNTLEFLNFFDEATKATQIN-GNPVLMAGDIIIMDNCAIHRHNRAGDALGEWLDGCSFVYLPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-5 EPal ITVNVLAGLNGIYEMNTIHGSDTLIFLDFFSQAQKAANIEETRPALEVGDIIVMDNCPHNNAGGTKLEWLDGDRNIELVYTPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-3 AYon ITVNVLAGLNGIYEMNTIHGSDTLIFLDFFSQAQKAANIEETRPALEVGDIIVMDNCPHNNAGGTKLEWLDGDRNIELVYTPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-4 ATene ITVNLVLAGLNGIYEMNTIHGSDTLIFLDFFSQAQKAANIEETRPALEVGDIIVMDNCPHNNAGGTKLEWLDGDRNIELVYTPYSPENPABEVLVFNKLLKILKREEYV  
L31-1 MCap TTLNMLVSLNGPEYYSIVSGATNTARLFSFQEAESVNIETGRPCLEVGDIIVMDNLSHHEGGEILEEVEFGTGMIELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-NGNLK  
L31-1 AMic TTLNMLVSLNGPEYYSIVSGATNTARLFSFQEAESVNIETGRPCLEVGDIIVMDNLSAHHYEGGEILEEVEFGTGMIELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-NGEFQ  
L31-4 MCac TTLNMLVSLNGPEYYSIVSGATNTARLFSFQEAESVNIETGRPCLEVGDIIVMDNLSAHHYEGGEILEEVEFGTGMIELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-NGEFQ  
L31-3 DLin TTLNMLVSLNGPEYYSIVSGATNTARLFSFQEAESVNIETGRPCLEVGDIIVMDNLSAHHYEGGEILEEVEFGTGMIELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-NGEFQ  
L31-5 ACyt TTLNMLVSLNGPEYYSIVSGATNTARLFSFQEAESVNIETGRPCLEVGDIIVMDNLSAHHYEGGEILEEVEFGTGMIELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-NGEFQ  
L31-1 AAwi TTLNMLVSLNGPEYYSIVSGATNTARLFSFQEAESVNIETGRPCLEVGDIIVMDNLSAHHYEGGEILEEVEFGTGMIELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-NGEFQ  
L31-3 AInt ITLNLFLAGVGLKYANIYQASNSIEFLRFFSEASQTVDPNTRVLEVGDIIVMDNFAAHHGDAEVALRSFLNDVGMELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-KYQYQ  
L31-6 AYon ITLNLFLAGVGLKYANIYQASNSIEFLRFFSEASQTVDPNTRVLEVGDIIVMDNFAAHHGDAEVALRSFLNDVGMELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-KYQYQ  
L31-1 PAus LTLNLFLVGYDGVKYGNTIEGASNSVOLFRRFFDEASQTVDPNTRVLEVGDIIVMDNFAAHHGDAEVALRSFLNDVGMELLYTPYSPDLNPIEFCFNKVKLL-KYQYQ

Рис. 3. Множественное выравнивание последовательностей транспозаз L31-транспозонов шестилучевых кораллов. Названия потенциально-функциональных элементов обозначены полужирным курсивом. α-спирали ДНК-связывающего домена выделены серым. Предполагаемый NLS обозначен полужирным курсивом. Триада DDE каталитического домена показана черным цветом. GPRK-мотив обозначен полужирным и подчеркнут.

*L31-duo* было выделено девять кластеров (рис. 2, доп. материалы 3).

#### Структурные особенности L31-транспозонов стрекающих

В работе [9] описано, что практически все изученные авторами элементы *L31* моллюсков имели белок *OPC2*, при этом довольно часто этот белок был потенциально-функциональным. У изученных кораллов, из 172 выявленных элементов, 96 имели белок *OPC2*, но следует отметить, что ни один из этих белков не был потенциально-функциональным. Все белки *OPC2* имели существенные повреждения (множественные стоп-кодоны, сдвиги рамки считывания). У 76 элементов белок *OPC2* не обнаружен совсем. Таким образом, в отличие от моллюсков, элементы стрекающих подкласса *Hexacorallia* гораздо хуже сохранились.

Существенное различие в структуре между *L31*-транспозонами моллюсков и стрекающих заключается в направлении *OPC* транспозазы и *OPC2* (рис. 1). Во всех изученных элементах шестилучевых кораллов *OPC* транспозазы и *OPC2* направлены к центру (друг к другу стоп-кодонами, в направлении 5'–3'... 3'–5'), тогда как в элементах *L31* моллюсков они направлены вовне (друг к другу старт-кодонами, в направлении 3'–5'... 5'–3').

По первичному анализу (доп. материалы 2) 104 элемента имеют потенциально-функциональную транспозазу, а 68 не имеют таковой. У некоторых элементов количество копий, имеющих потенциально-функциональную транспозазу, колебалось от одной до пяти, но у большинства элементов было представлено одна–две.

Общая длина элементов колебалась от 774 пн (у *L31-1.3\_SMer*) до 7598 пн (у *L31-1.2\_HCri*). Такой большой разброс длины элементов можно связать с тем, что элементы (будучи неподверженными отбору) сохраняются даже при значительных нарушениях (делециях и инсерциях). КИП обнаружены у 119 элементов. Длина их варьировала от 19 пн до 212 пн. У 53 транспозонов *L31* отсутствуют КИП. У элемента *L31-1\_AMur* семь нуклеотидов КИП “наползает” на начало *OPC* транспозазы. Длина потенциально функциональной транспозазы была типична и колебалась в районе 318–367 а.о. Длина нетранспозазного белка от –73 а.о. (у *L31-2\_AMyr*) до 406 а.о. (у *L31-1\_ATene*), но, как было сказано выше, все эти белки имели делеции. Расстояние между нетранспозазным белком и транспозазой колебалось от 385 пн (у *L31-3\_ANas*) до 4755 пн (у *L31-2\_AEqu*). У 14 элементов расстояние между транспозазой и *OPC2* равнялось 447 пн. По-видимому, такое расстояние могло быть у предкового элемента, позже оно подверглось вставкам или делециям, что мы наблюдаем у других элементов, а у этих 14 сохранилось без изменений.

Проведенный доменный анализ был выборочным из-за большого количества обнаруженных транспозонов (рис. 3). Мы взяли 27 условно потенциально-функциональных элементов. У 13 элементов присутствуют все шесть  $\alpha$ -спиралей ДНК-связывающегося домена, каталитический домен и неповрежденная структура *OPC*. Однако GRPR-подобный мотив обнаружен не у всех, у элемента *L31-3\_AInt* его нет. Таким образом, по результатам доменного анализа только 12 элементов имеют рабочую структуру. Если сделать проекцию полученных результатов на все 104 элемента, обозначенных нами потенциально-функциональными (доп. материалы 2), то после доменного анализа больше половины кандидатов, вероятно, не имели бы рабочей структуры.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

На данный момент установлено, что *L31*-транспозоны присутствуют в геномах двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) [9, 12] и шестилучевых кораллов (*Hexacorallia*) [12], а также есть свидетельства их наличия у нематод (*Nematoda*) [13]. Тогда как *L31*-транспозоны двустворчатых моллюсков и шестилучевых кораллов изучены достаточно детально, с присутствием и разнообразием данных элементов у нематод еще только предстоит разобраться. По усредненным оценкам, время дивергенции стрекающих (*Cnidaria*), к которым относятся коралловые полипы, и двусторонне-симметричных (*Bilateria*), к которым относятся моллюски, составляет 685 миллионов лет назад (млн. лет назад) (604–1250 млн лет назад) [26]. Присутствие *L31*-транспозонов в таких эволюционно отдаленных группах может свидетельствовать о том, что один или оба таксона получили данную группу МГЭ через горизонтальный перенос. Горизонтальный перенос играет значимую роль в распространении и эволюции МГЭ [27, 28].

Среди *L31*-транспозонов моллюсков был выявлен элемент *L31-3a\_SGlo* [9], у которого *OPC2* направлена как у всех моллюсков (от центра к КИП), тогда как *OPC*-транспозазы – как у шестилучевых кораллов (к центру) (рис. 1). Наличие такого промежуточного варианта дает основания предполагать, что возможно, среди моллюсков появился предковый вариант *L31-duo* (с *OPC*, направленными к центру), который в результате горизонтального переноса проник в геном предка шестилучевых кораллов. На это указывает и структура филогенетического древа (рис. 2). Моллюски в группе *L31-duo* формируют три клады (*L31-1*, *L31-2/L31-3* и *L31-4*), тогда как кораллы одну, близкую к кладе моллюсков *L31-4*. Однако общая ветвь элементов *L31-4* моллюсков и всех *L31-duo* кораллов имеют довольно низкую бутстреп-поддержку, что не дает оснований утверждать об эволюционной близости

данных групп. Вполне вероятно, что кораллы могли получить *L31*-транспозон из клады *L31-3* моллюсков, к которой относится элемент *L31-3a\_SGlo*.

Пока нет возможности однозначно установить какая из групп, *L31-duo* или *L31-uno*, является первичной. Однако наличие в группе *L31-uno* элемента кораллов *L31-5\_DLin* с ОРС2 (доп. материалы 3) указывает на то, что эта *L31-uno* возникла в результате появления среди копий предкового *L31*-транспозона кораллов варианта с каталитическим доменом DD38E и с последующей потерей ОРС2 большинством потомков. При этом моллюски получили *L31-uno* обратно через горизонтальный перенос.

Однако не исключен и следующий сценарий. *L31*-транспозоны включают две группы *L31-duo* и *L31-uno*, отличающиеся и по паттерну каталитического домена, и по структуре. При этом в обеих группах есть элементы и моллюсков, и кораллов. Это дает основания предполагать, что разделение данных групп произошло до дивергенции таксонов животных и, соответственно, все разнообразие *L31*-транспозонов является следствием вертикального наследования. При этом у преобладающего большинства таксонов животных *L31*-транспозоны были потеряны. Однако, мы все же склоняемся к первому варианту. Кроме того, есть еще *L31*-транспозоны нематод, и по мере поступления новых данных картина будет проясняться.

После переноса в новый геном МГЭ проходят череду этапов, названных “жизненным циклом” [29]. При успешной колонизации генома нового хозяина, для МГЭ может наступить этап диверсификации, когда под воздействием мутационных процессов в отсутствие отбора появляется множество различных вариантов элемента. Чем выше транспозиционная активность на ранних порах, тем, соответственно, будет выше разнообразие копий-потомков. Элементы актиний и склерактиний представлены во всех девяти кластерах *L31-duo*, а также не создают очевидных коррелирующих с таксонами клад в группе *L31-uno* (рис. 2, доп. материалы 3), соответственно основная диверсификация *L31*-транспозонов кораллов произошла до дивергенции (436.6–538.7 млн. лет назад [26]) этих двух групп шестилучевых кораллов. Высокое разнообразие *L31*-транспозонов кораллов свидетельствуют об очень высокой активности ранних копий. В то же время, в отличие от моллюсков, элементы шестилучевых кораллов гораздо хуже сохранились. Возможно, это связано с более ранним подавлением активности *L31*-транспозонов.

В результате настоящего исследования *L31*-транспозонов шестилучевых кораллов была получена детальная информация о распространении, разнообразии и структуре элементов. Были выявлены две группы: *L31-duo* и *L31-uno*,

отличающиеся и по паттерну каталитического домена, и по структуре. В результате реконструкции эволюции *L31*-транспозонов, основанной на данных о филогении, распространении, разнообразии и структуре мы предполагаем, что шестилучевые кораллы получили *L31*-транспозоны от двусторчатых моллюсков. При этом выщепившаяся группа *L31-uno* возможно была получена моллюсками в результате горизонтального переноса уже от кораллов. Исследования распространения и разнообразия МГЭ у морских беспозвоночных будут способствовать лучшему пониманию процессов эволюции МГЭ и их роли в эволюционной истории видов.

Работа выполнялась в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, номер гос. регистрации 121041400077-1.

Исследование одобрено Этическим комитетом Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, от 25.09.2023 г., номер протокола 5.

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. *Kojima K.K.* Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements // *Genes Genet. Syst.* 2020. V. 94. № 6. P. 233–252. <https://doi.org/10.1266/ggs.18-00024>
2. *Wells J.N., Feschotte C.A.* Field guide to eukaryotic transposable elements // *Annu. Rev. Genet.* 2020. V. 54. P. 539–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>
3. *Wicker T., Sabot F., Hua-Van A. et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 12. P. 973–982. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>
4. *Kapitonov V.V., Jurka J.* A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 411–412. <https://doi.org/10.1038/nrg2165-c1>
5. *Yuan Y.W., Wessler S.R.* The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 19. P. 7884–7889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104208108>
6. *Arkhipova I.R.* Using bioinformatic and phylogenetic approaches to classify transposable elements and

- understand their complex evolutionary histories // *Mob. DNA*. 2017. V. 8. № 19. <https://doi.org/10.1186/s13100-017-0103-2>
7. Gao B., Wang Y.L., Diaby M. et al. Evolution of *pogo*, a separate superfamily of *IS630-Tc1-mariner* transposons, revealing recurrent domestication events in vertebrates // *Mob. DNA*. 2020. V. 11. № 25.
  8. Shi S., Puzakov M., Guan Z. et al. Prokaryotic and eukaryotic horizontal transfer of *Sailor* (dd82e), a new superfamily of *IS630-Tc1-Mariner* DNA-transposons // *Biology (Basel)*. 2021. V. 10. № 10. <https://doi.org/10.3390/biology10101005>
  9. Puzakov M.V., Puzakova L.V. Structure and evolution of DNA transposons of the L31 superfamily in Bivalves // *Mol. Biol.* 2024. V. 58. № 1. P. 57–75. <https://doi.org/10.1134/S0026893324010114>
  10. Shi S., Puzakov M.V., Puzakova L.V. et al. *Hiker*, a new family of DNA transposons encoding transposases with DD35E motifs, displays a distinct phylogenetic relationship with most known DNA transposon families of *IS630-Tc1-mariner* (*ITm*) // *Mol. Phylog. Evol.* 2023. V. 188. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107906>
  11. Aziz R.K., Breitbart M., Edwards R.A. Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature // *Nucl. Ac. Res.* 2010. V. 38. № 13. P. 4207–4217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq140>
  12. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. An Analysis of *IS630/Tc1/mariner* transposons in the genome of a pacific oyster *Crassostrea gigas* // *J. Mol. Evol.* 2018. V. 86. № 8. P. 566–580. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9868-2>
  13. Dupeyron M., Baril T., Bass C., Hayward A. Phylogenetic analysis of the *Tc1/mariner* superfamily reveals the unexplored diversity of *pogo*-like elements // *Mob. DNA*. 2020. V. 11. № 21. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00212-0>
  14. Tellier M., Bouuaert C.C., Chalmers R. *Mariner* and the *ITm* superfamily of transposons // *Microbiol. Spectr.* 2015. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0033-2014>
  15. Ivics Z., Izsvák Z. *Sleeping Beauty* transposition // *Microbiol. Spectr.* 2015. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014>
  16. Jahn C.L., Doktor S.Z., Frels J.S. et al. Structures of the *Euplotes crassus Tec1* and *Tec2* elements: Identification of putative transposase coding regions // *Gene*. 1993. V. 133. № 1. P. 71–78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90226-s](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90226-s)
  17. Chen X., Landweber L.F. Phylogenomic analysis reveals genome-wide purifying selection on *TBE* transposons in the ciliate *Oxytricha* // *Mob. DNA*. 2016. V. 7. № 2. <https://doi.org/10.1186/s13100-016-0057-9>
  18. Dupeyron M., Singh K.S., Bass C., Hayward A. Evolution of *Mutator* transposable elements across eukaryotic diversity // *Mob. DNA*. 2019. V. 10. № 12. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0153-8>
  19. Doak T.G., Witherspoon D.J., Jahn C.L., Herrick G. Selection on the genes of *Euplotes crassus Tec1* and *Tec2* transposons: Evolutionary appearance of a programmed frameshift in a *Tec2* gene encoding a tyrosine family site-specific recombinase // *Eukaryot. Cell*. 2003. V. 2. № 1. P. 95–102. <https://doi.org/10.1128/EC.2.1.95-102.2003>
  20. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs // *Nucl. Ac. Res.* 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
  21. Buchan D.W.A., Jones D.T. The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on // *Nucl. Ac. Res.* 2019. V. 47. P. 402–407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>
  22. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. WebLogo: A sequence logo generator // *Genome Res.* 2004. V. 14. № 6. P. 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
  23. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. № 2. P. 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
  24. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F. et al. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 6. P. 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
  25. Yamada K.D., Tomii K., Katoh K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data – Reexamination of the usefulness of chained guide trees // *Bioinformatics*. V. 32. № 21. P. 3246–3251. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw4122016>
  26. Kumar M., Suleski J.E., Craig A.E. et al. TimeTree 5: An expanded resource for species divergence times // *Mol. Biol. Evol.* 2022. V. 39(8). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac174>
  27. Wallau G. L., Ortiz M. F., Loreto E. L. Horizontal transposon transfer in eukarya: detection, bias, and perspectives // *Genome Biol. Evol.* 2012. V. 4. № 8. P. 689–699. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs055>
  28. Melo E.S., Wallau G.L. Mosquito genomes are frequently invaded by transposable elements through horizontal transfer // *PLoS Genet.* 2020. V. 16(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008946>
  29. Blumenstiel J.P. Birth, school, work, death, and resurrection: The life stages and dynamics of transposable element proliferation // *Genes (Basel)*. 2019. V. 10. № 5. <https://doi.org/10.3390/genes10050336>

## ***L31* Transposons of Hexacorallia: Distribution, Diversity and Evolution**

**L. V. Puzakova<sup>1</sup>, M. V. Puzakov<sup>1, \*</sup>, P. M. Puzakova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Branch in Sevastopol, Sevastopol, 299001 Russia*

*\*e-mail: puzakov.mikh@yandex.ru*

Transposable elements (TE) of eukaryotes – retrotransposons and DNA transposons – are nucleotide sequences that can move from locus to locus of the genome, as well as between the genomes of different organisms. *L31* DNA transposons are an ancient and diverse group belonging to the large IS630/Tc1/mariner group. *L31* transposons are not widespread and are present in a limited number of taxa. In addition to the sequence encoding the DDE/D transposase, *L31* transposons carry another ORF (ORF2). Detailed analysis of *L31* elements in the genomes of six-rayed corals has provided detailed information on the distribution, diversity and structure of the elements. Two large groups, *L31*-duo and *L31*-uno, were identified, differing in both catalytic domain pattern and structure. As a result of reconstruction of the evolution of *L31* transposons, it was suggested that six-rayed corals received *L31* transposons from bivalves. At the same time, the split-off group *L31*-uno may have been obtained by mollusks as a result of horizontal transfer from corals. Studies of the distribution and diversity of TE in marine invertebrates will contribute to a better understanding of the evolutionary processes of TE and their role in the evolutionary history of species.

**Keywords:** DNA transposons, *L31* transposons, coral polyps, genome evolution, biodiversity.

**ДИНАМИКА СИСТЕМЫ В-ХРОСОМ В ПОПУЛЯЦИИ  
ВОСТОЧНОАЗИАТСКОЙ МЫШИ *Apodemus peninsulae*  
(Mammalia, Rodentia) СЕВЕРНОГО РЕГИОНА  
ПРИТЕЛЕЦКОЙ ТАЙГИ ГОРНОГО АЛТАЯ ЗА 36-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД**

© 2024 г. И. А. Жигарев<sup>1, \*</sup>, Ю. М. Борисов<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Московский педагогический государственный университет, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: i.zhigarev@gmail.com

\*\*e-mail: boriss-spb@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

После доработки 08.11.2023

Принята к публикации 12.01.2024 г.

Прослежен процесс изменения числа и морфологии В-хромосом в популяции у мышей *Apodemus peninsulae* северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая за 36-летний период (1978–2014 гг.) Выделено три временных периода. С 1978 по 2002 (24 года) – период устойчивого роста числа В-хромосом, с относительно равномерным средним увеличением на 1.4 хромосомы в десятилетие (от  $3.17 \pm 0.2$  до  $6.5 \pm 0.54$ ). После 2002 и до 2012 – период стабилизации показателя в узком диапазоне 6.3–6.9, но на более чем двукратно высоком уровне по сравнению с началом 1980-х г. (отличия достоверны), период после 2012 г. — наметившаяся тенденция к снижению числа дополнительных хромосом, до  $4.91 \pm 0.36$  (отличия также достоверны). Сходную динамику имеет и изменение индекса условной массы В-хромосом ( $mB$ ), причем в период стабилизации он был на максимуме для вида. Динамика разных морфотипов (вариантов) В-хромосом показывает неодинаковый вклад в общую динамику. Основной вклад вносят крупные, средние и мелкие метацентрические В-хромосомы. Микро-В-хромосомы и акроцентрики отсутствуют в период роста и появляются в период стабилизации на максимуме остальных показателей.

*Ключевые слова:* *Apodemus peninsulae*, динамика добавочных В-хромосом, Bs, кариотип.

DOI: 10.31857/S0016675824060035 EDN: BYDWNA

Регулярные цитогенетические исследования аномальных кариотипов млекопитающих, имеющих в своем составе дополнительные хромосомы (В-хромосомы, или Bs), начались во второй половине XX в. К настоящему времени накопленный материал уже позволяет не только делать существенные выводы в отношении общих закономерностей распределения дополнительных хромосом в разных частях ареала видов, т.е. в пространстве [1–5], но и выявлять изменения этих закономерностей во времени [6–9]. Такие возможности уникальны, при том что мы до сих пор имеем слабые представления о роли и наследовании дополнительных хромосом [10–14]. В научных изысканиях долговременные ряды данных обладают особой ценностью, тем более если они посвящены малопонятному феномену накопления в кариотипе дополнительных структур. Из известных нам работ в этой области следует указать на исследование

[7] по анализу кариотипов копытных леммингов (*Dicrostonyx torquatus*), в котором выявлена хронографическая стабильность систем В-хромосом в разных популяциях на полярном Урале, севере Якутии и на западе Чукотки. Частоты В-хромосом и их морфологические особенности были постоянными в течение 3–9 лет наблюдений. В исследовании показано, что система В-хромосом у копытных леммингов хорошо сбалансирована и весьма стабильна, а также, по-видимому, находится под достаточно жестким генетическим контролем [7]. М. Вуйошевич на протяжении пяти лет отмечал относительно постоянные частоты встречаемости и число В-хромосом в локальной популяции желтогорлой мыши (*A. flavicollis*) в Сербии [2, 15]. В этом регионе желтогорлые мыши имеют небольшое число дополнительных хромосом (обычно одну–две). Частота практически не менялась на фоне изменения плотности популяции мышей. Стабильную

частоту встречаемости дополнительных хромосом для того же вида отмечал и Д. Войчик с соавторами в Беловежской Пуще (Польша), где наблюдения продолжались на протяжении трех лет [16]. В другом примере, с восточноазиатскими мышами (*A. peninsulae*), обитающими в Уссурийском заповеднике, также была показана относительная стабильность среднего числа В-хромосом в популяциях, но уже за более длительный срок — 26 лет (1971–1997 гг.) [10, 17, 18]. Относительное постоянство популяционной системы В-хромосом *A. peninsulae* выявлено нами и для популяций Южного Прибайкалья [9]. Исследование в этом регионе продолжалось в течение 35 лет (1984–2019 гг.). Нужно сказать, что длительных наблюдений динамики дополнительных хромосом в популяциях грызунов не так уж много. Кроме работ, в которых исследователи описывают относительную стабильность популяционных показателей, характеризующих Vs во времени, есть и другие данные. Например, Я. Благоевич и М. Вуйошевич [19], отмечали сезонные изменения в частотах встречаемости дополнительных хромосом в популяции желтогорлых мышей в Югославии (Сербии), в год их аномально высокой плотности. Доля особей с дополнительными хромосомами падала от весны к осени. Авторы предполагают, что это связано с более высокой элиминацией мышей, имеющих Vs, в год аномально высокой плотности. За длительный период (1978–2006 гг.) изучения кариотипов восточноазиатских мышей (*A. peninsulae*) северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая, включая окрестности пос. Артыбаш, нами был обнаружен феномен существования и достоверного увеличения числа В-хромосом в этой популяции [8]. Аналогичный процесс наблюдали и в популяции мышей на южном берегу Телецкого озера (расстояние между локалитетами более 70 км) с 1980 по 2011 г. [20]. Что интересно, в этих популяциях, населяющих побережье севера и юга Телецкого озера, на начальном этапе наблюдений (продолжительностью более 25 лет) отсутствовали особи с микро-В-хромосомами. Это кардинально отличало эти популяции от популяций, расположенных севернее и восточнее — в Сибири, Забайкалье и на Дальнем Востоке, где микро-В-хромосомы обычны [3, 10]. Точечные В-хромосомы в небольшом количестве были обнаружены в этих популяциях лишь на стадиях, когда среднее число Vs выросло в популяциях — на юге до 4.3, а на севере до 6.5 (в 1.6–2 раза, по сравнению с начальными годами наблюдений). В целом наблюдения за долговременной динамикой Vs дают противоречивые материалы. С одной стороны показывают относительную стабильность характеристик Vs в локальных популяциях, с другой — их динамичность.

Такие противоречивые материалы требовали продолжения исследований динамики системы В-хромосом этого вида в районах Прителецкой

тайги, поэтому в период 2008–2014 гг. мы продолжили изучение изменчивости числа и морфотипов Vs у мышей *A. peninsulae* в окрестностях пос. Артыбаш.

Цель работы — анализ долговременной, 36-летней, динамики числа и морфотипов добавочных хромосом в популяции восточноазиатских (корейских) мышей северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2008, 2010, 2011, 2012 и 2014 гг. в окрестностях пос. Артыбаш (Республика Алтай, территория НПФ Института систематики и экологии животных СО РАН) были отловлены 71 особь *A. peninsulae*. Координаты стационара — 51°47'42.4" N 87°18'14.1" E. Отлов живых мышей осуществляли живоловками в конце сезона размножения, в августе. Получены новые данные по хромосомным наборам 71 особи (табл. 1). Хромосомные препараты готовили по стандартной методике [21], анализ препаратов проведен на микроскопе Leica DM 5000. Для определения числа и морфотипов (вариантов) В-хромосом исследовали не менее 20 метафазных клеток от каждого животного. Для животных с мозаицизмом по числу хромосом использовали только модальное число хромосом. В-хромосомы были разделены по морфотипу на пять классов [3], четыре из которых представлены относительно крупными В-хромосомами, размер которых превышает 0,1 размера от самой большой акроцентрической А-хромосомы (ее размер 3.5–4.0 мкм). К первому классу отнесены большие двуплечие макро-В-хромосомы, от половины размера самой крупной аутосомы до размера, сравнимого с размером всей хромосомы (крупные метацентрики). Второй класс включал средние метацентрики размером от 0.5 до 0,3 размера самой большой аутосомы. Третий класс был представлен небольшими двуплечими В-хромосомами размером примерно 0.3–0.1 размера самой крупной аутосомы (мелкие метацентрики). В четвертый класс вошли очень редко встречающиеся и, как правило, относительно небольшие акроцентрические В-хромосомы, равные по размерам В-хромосомам третьего класса. В пятый класс вошли микро-В-хромосомы — это точечные В-хромосомы с центромерами неясного положения.

Для статистической регистрации материала применяли разработанную Ю.М. Борисовым формулу цифрового кодирования морфотипов (вариантов) В-хромосом [22, 23].

Формулы вариантов представлены в табл. 1. Статистический анализ проведен по стандартным методикам с использованием программы Statistica 12. Для сравнения средних, после проверки на нормальность распределения, использовали

**Таблица. 1.** Формулы изменчивости вариантов (морфотипов) системы В-хромосом (Bs) восточноазиатских (корейских) мышей (*A. peninsulae*) окрестностей пос. Артыбаш (северный регион Прителецкой тайги, Республика Алтай) в 2008–2014 гг.

№ п/п	Год отлова	Пол	Число хромосом		Формула вариантов Bs
			$2n = 48 + Bs$	Bs	
1	2008	♂	52	4	04.0.1.1.1.01
2	2008	♀	52	4	04.0.2.1.1.00
3	2008	♂	53	5	05.1.1.2.0.01
4	2008	♂	54	6	06.1.1.2.0.02
5	2008	♀	54	6	06.1.2.1.1.01
6	2008	♂	54	6	06.2.1.2.1.00
7	2008	♂	54	6	06.1.1.2.2.00
8	2008	♀	55	7	07.0.2.2.2.01
9	2008	♀	55	7	07.2.1.2.2.00
10	2008	♂	55	7	07.1.2.2.2.00
11	2008	♂	56	8	08.0.1.2.4.01
12	2008	♀	55	7	07.2.3.0.1.01
13	2008	♀	56	8	08.3.2.1.1.01
14	2008	♂	57	9	09.1.2.4.1.01
15	2008	♀	58	10	10.3.1.2.1.03
16	2008	♂	58	10	10.3.1.6.0.00
17	2010	♂	52	4	04.1.0.3.0.00
18	2010	♀	53	5	05.1.2.2.0.00
19	2010	♂	53	5	05.2.2.1.0.00
20	2010	♀	54	6	06.2.1.3.0.00
21	2010	♂	54	6	06.2.2.2.0.00
22	2010	♂	54	6	06.1.1.4.0.00
23	2010	♂	54	6	06.2.0.4.0.00
24	2010	♀	55	7	07.1.2.4.0.00
25	2010	♀	55	7	07.3.1.3.0.00
26	2010	♀	57	9	09.3.2.4.0.00
27	2010	♂	58	10	10.2.2.6.0.00
28	2011	♀	51	3	03.2.0.1.0.00
29	2011	♀	52	4	04.0.0.2.0.02
30	2011	♂	52	4	04.3.0.1.0.00
31	2011	♀	52	4	04.0.2.2.0.00
32	2011	♂	53	5	05.0.2.2.0.01
33	2011	♀	53	5	05.1.1.3.0.00
34	2011	♂	53	5	05.0.0.5.0.00
35	2011	♂	54	6	06.1.2.2.0.01

Таблица 1. (окончание)

№ п/п	Год отлова	Пол	Число хромосом		Формула вариантов Bs
			$2n = 48 + Bs$	Bs	
36	2011	♂	54	6	06.2.2.1.0.01
37	2011	♀	55	7	07.2.0.4.0.01
38	2011	♀	56	8	08.1.2.2.1.0.2
39	2011	♂	56	8	08.0.4.4.0.0.0
40	2011	♂	56	8	08.2.6.0.0.0.0
41	2011	♀	57	9	09.2.2.4.0.0.1
42	2011	♀	57	9	09.2.5.1.1.0.0
43	2011	♀	58	10	10.2.2.4.0.0.2
44	2012	♀	51	3	03.2.0.1.0.0.0
45	2012	♀	52	4	04.0.0.2.0.0.2
46	2012	♂	52	4	04.3.0.1.0.0.0
47	2012	♀	53	5	05.0.2.3.0.0.0
48	2012	♂	53	5	05.0.2.2.0.0.1
49	2012	♀	53	5	05.1.1.3.0.0.0
50	2012	♂	53	5	05.0.0.5.0.0.0
51	2012	♂	54	6	06.1.2.2.0.0.1
52	2012	♂	54	6	06.2.2.1.0.0.1
53	2012	♀	55	7	07.2.0.4.0.0.1
54	2012	♀	56	8	08.1.2.2.1.0.2
55	2012	♂	56	8	08.0.4.4.0.0.0
56	2012	♂	56	8	08.2.6.0.0.0.0
57	2012	♀	57	9	09.2.2.4.0.0.1
58	2012	♀	57	9	09.2.5.1.1.0.0
59	2012	♀	58	10	10.2.2.4.0.0.2
60	2014	♀	51	3	03.2.1.0.0.0.0
61	2014	♀	51	3	03.2.0.1.0.0.0
62	2014	♂	52	4	04.0.0.2.0.0.2
63	2014	♀	52	4	04.3.0.1.0.0.0
64	2014	♂	53	5	05.0.2.3.0.0.0
65	2014	♀	53	5	05.0.2.2.0.0.1
66	2014	♂	53	5	05.1.1.3.0.0.0
67	2014	пол неизвестен	53	5	05.0.0.5.0.0.0
68	2014	♂	54	6	06.1.2.2.0.0.1
69	2014	♂	54	6	06.1.2.2.0.0.1
70	2014	♀	54	6	06.2.2.1.0.0.1
71	2014	♀	55	7	07.2.0.4.0.0.1

Примечание. Формула вариантов Bs обозначает: первые две цифры, отделенные точкой, – число всех Bs; последующие, отделенные точками, – число Bs в каждом из пяти морфотипов, от первого до пятого класса.

критерий Стьюдента ( $t$  - критерий). Для оценки степени флуктуации показателей во времени использовали индекс стабильности –  $IS$  [24]. Показатель  $IS$  принимает значение от 0 до 1 и легко интерпретируется. При значении близком к «0» он показывает предельную нестабильность, а при «1» – наоборот, предельную стабильность, обычно этот показатель принимает промежуточные значения. Разнообразию морфотипов В-хромосом оценивали индексом разнообразия Животовского [25, 26], который «чувствителен» к редким морфотипам хромосом в выборке:

$$\mu = (\sum \sqrt{p_i})^2,$$

где  $p_i$  – доля  $i$ -того класса морфотипов  $B_s$  в выборке.

Показатель  $\mu$ , как и другие индексы разнообразия, демонстрирует степень разнообразия с учетом частоты встречаемости морфотипов  $B_s$ . Кроме этого есть возможность оценить статистическую значимость индекса через расчет его статистической ошибки (SE). При равных частотах, когда приходится говорить о максимальной выравненности разных морфотипов  $B_s$  в выборке и максимальном разнообразии, показатель  $\mu$  в нашем случае равен 5 (т.е. числу классов морфотипов  $B_s$ ). При монодоминантности, когда выборка представлена только одним классом морфотипа  $B_s$ ,  $\mu = 1$ . В остальных случаях, при неравномерном распределении, что встречается значительно чаще,  $\mu$  принимает промежуточные значения.

Индекс условной “массы” (индекс  $mB$ ) В-хромосом рассчитан по методу предложенному Г.В. Рослик и И.В. Картавцевой [27].

В анализе долговременных рядов изменений числа и морфотипов В-хромосом кроме оригинального материала за период 2008–2014 гг. (71 особь) использованы опубликованные нами ранее данные по 82 особям за предшествующий период, с 1978 по 2006 гг. [8]. Из этой публикации использовали материал только по мышам локальной популяции окрестностей пос. Артыбаш (северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая), материал был перепроверен и статистически проанализирован заново. Обнаружены незначительные неточности в сравнении с опубликованными ранее данными, которые исправлены. В частности, в нашей работе [8] особь (зоологический номер 32), которая была отловлена в 2002 г., ошибочно отнесена к выборке из локальной популяции окрестностей пос. Артыбаш. Она была отловлена в 50 км севернее, в районе с. Турочак, Республика Алтай (52°17'28.3"N 87°07'17.1"E). Она исключена из анализа в этой публикации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость числа и морфологии В-хромосом в кариотипах 71 особи мышей, отловленных в северном регионе Прителецкой тайги в период с 2008 по 2014 г., представлена в табл. 1. Далее в статье анализируется объединенный материал по 153 особям (за период 1978–2014 гг.).

### Число В-хромосом

Основной набор А-хромосом *A. peninsulae* стабильен и состоит из 48 акроцентрических хромосом (46 аутосом и двух половых хромосом). Дополнительные хромосомы ( $B_s$ ) кариотипа мышей относительно изменчивы как по числу, так и по морфологии. За 36-летний период наблюдений в окрестностях северных береговых биотопов оз. Телецкое только одна особь не имела  $B_s$ , остальные 153 были с дополнительными хромосомами. Их число варьировало от 1 до 10, что можно характеризовать как обычный диапазон в сравнении с другими участками ареала [3]. Наибольшее число  $B_s$  отмечено в Центральной Сибири, до 30 [3], в Тыве, до 15 [3], в Китае (провинция Гансю) – до 14 [28]. В ряде районов максимальные значения низкие, так в Иркутской области, максимальное число  $B_s$  – 3 [9], а Приморье – 6 [4, 10].

Долговременные наблюдения за особенностями изменения числа и формы добавочных хромосом в популяциях крайне редки. Ранее мы провели описание характера этих изменений в исследуемом районе за длительное время с 1978 по 2006 гг. [8]. Полученные результаты уверенно демонстрировали устойчивый и достоверный рост числа добавочных хромосом в популяции этого региона Горного Алтая за указанный период (рис. 1). В начале статьи мы показали, что в других районах – таких как Южное Прибайкалье – восточноазиатских мышей напротив показало отсутствие каких-либо статистических изменений показателей кариотипа добавочных хромосом. Здесь отмечены выраженная стабильность и низкая вариабельность  $B_s$  как для количественных показателей, так и для морфотипов добавочных хромосом. Очевидно, что эта динамика, наряду с “точечными” характеристиками популяционных показателей генотипов, показывает наличие региональных популяционных отличий закономерностей образования, наследования и распределения  $B_s$  по крайней мере у *A. peninsulae*.

Наблюдения за мышами из популяции северного региона Прителецкой тайги после 2008 г. показали стабилизацию кариотипа (рис. 1). Рассматривая всю динамику за 36 лет, можно выделить три временных периода. С 1978 по 2002 гг. (24 года) – период устойчивого роста числа В-хромосом, с относительно равномерным средним увеличением на 1.4 хромосомы в десятилетие (с  $3.17 \pm 0.2$  до 6.5

$\pm 0.54$ ). Отличия средних между периодами начала роста (1978–1980 гг.) и конца роста (2002 г.) достоверны при  $p = 0.0000001$ . Период стабилизации, продолжавшийся после 2002, до 2012, на более чем двукратно высоком уровне, по сравнению с началом 1980-х годов. И третий период (после 2012 г.) – наметившаяся тенденция к снижению числа дополнительных хромосом ( $4.91 \pm 0.36$ ). Изменения среднего числа Bs и их минимальных и максимальных показателей в разные периоды динамики показаны на рис. 2. Различия среднего числа Bs между разными периодами достоверны: между периодом роста и периодом стабилизации ( $p = 0.0000000000001$ ), между периодом стабилизации и периодом спада ( $p = 0.0069$ ).

Среднее число В-хромосом, наблюдаемое в период стабилизации (рис. 1) колебалось в узком диапазоне 6.3–6.9 (без достоверных различий между собой), что, вероятно, свидетельствует о достижении популяционного максимума уровня числа В-хромосом для мышей этой популяции в реальных экологических условиях. Именно в этот период встречаются мыши с максимальным значением в 10 добавочных хромосом. Однако эти встречи редки, по одному–двум зверькам в годовой выборке, что дает основание предполагать критичность для особей этой популяции такого большого числа В-хромосом. Предположительно необычно высокое число В-хромосом в популяции может приводить к негативным последствиям для ее особей. Показано отрицательное влияние увеличения числа В-хромосом на фенотипические признаки их носителей у особей *Dicrostonyx torquatus* с наибольшим числом В-хромосом и отмечена тенденция к снижению показателя репродуктивного успеха [7]. Критичность увеличения числа Bs обсуждается в работе М. Вуйошевич с соавт. [2]. Высокая, значимая и отрицательная корреляция между частотой встречаемости в популяции и количеством хромосом описана в нашей работе [3]. Это может свидетельствовать о наличии возможных механизмов элиминации особей или клеток с большим количеством Bs.

#### Индекс условной массы В-хромосом.

Схожая динамика отмечена и для среднего значения индекса условной “массы” (индекса  $mB$ ) В-хромосом (рис. 3). Напомним, что индекс позволяет охарактеризовать весь массив дополнительных хромосом в клетке. Чем он выше, тем “массивнее” набор дополнительных хромосом. Ранее мы отмечали [3], что в пределах обширного ареала вида в разных популяциях редко встречаются мыши, имеющие как малое, так и очень большое значение индекса  $mB$ . Чаще всего индекс принимает значения от 4 до 11 (более 50% случаев, при среднем –  $10.7 \pm 0.26$  и при моде = 4).

Возможно, что большая «масса» дополнительных хромосом в клетке осложняет процесс наследования и деления. Однако редкие встречи зверьков с малым значением индекса (0–3, всего 8% случаев по 598 зверькам со всего ареала [3]), поддерживают версию об адаптивности не просто наличия добавочных хромосом, а наличия определенной их “массы” в клетках восточноазиатских мышей. По нашим данным [3], средний показатель индекса  $mB$  на западе ареала (районы Центральной Сибири) существенно выше (практически в 2 раза), чем на востоке и юге (Прибайкалье, Дальний Восток, Япония, Монголия, Китай), –  $13.4 \pm 0.35$ , против  $7.0 \pm 0.26$ , отличия достоверны ( $p = 0.0000001$ ).

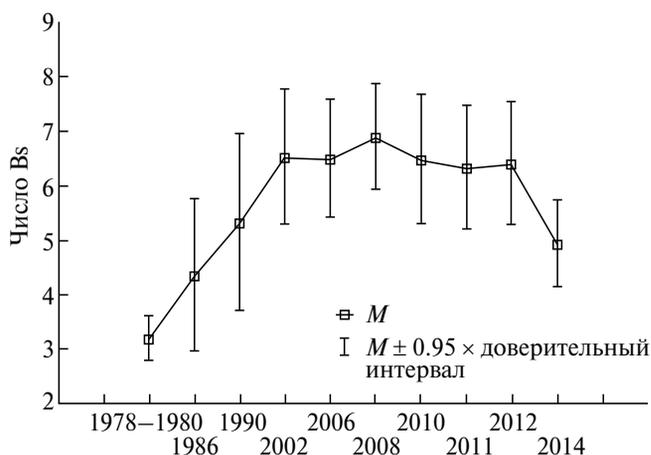


Рис. 1. Динамика среднего числа ( $M$ ) дополнительных хромосом (Bs) суммарно всех морфотипов у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в 1978–2014 гг.

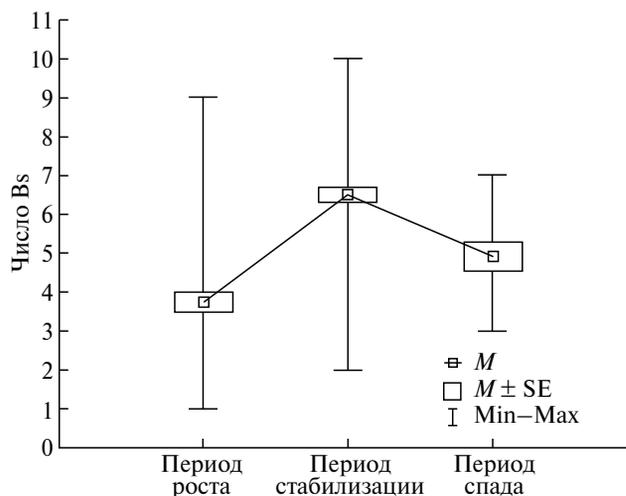
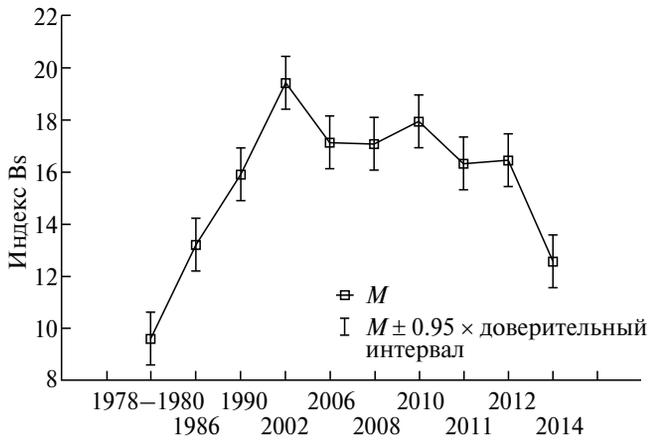


Рис. 2. Изменения среднего числа ( $M$ ) дополнительных хромосом (Bs) у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в разные периоды динамики Bs.



**Рис. 3.** Динамика среднего значения индекса условной «массы» В-хромосом ( $mB$ ) у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в период с 1978 по 2014 г.

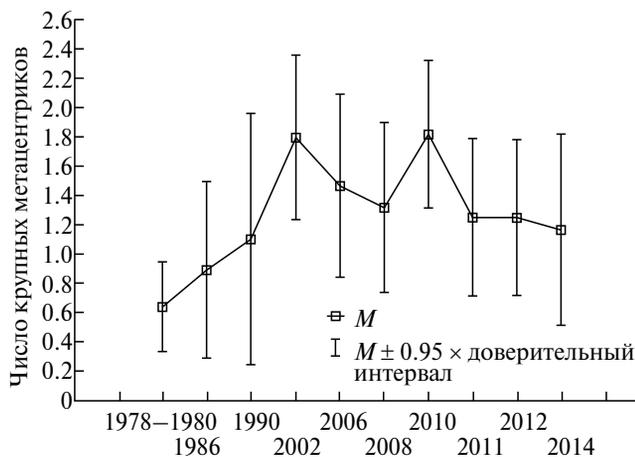
Все это укладывается в общую картину долговременной динамики индекса  $mB$  в окрестностях оз. Телецкое. В начале 80-х гг. XX века значение индекса  $mB$  было умеренным —  $9.6 \pm 0.67$ , несколько ниже среднего по региону. Как видно из рис. 3, неуклонный рост показателя закончился в 2002 г. на довольно высокой максимальной отметке —  $19.4 \pm 1.69$ , что редко встречается в других популяциях этого вида. Далее произошла стабилизация, опять же на относительно высоком уровне (от 16 до 18), с дальнейшей тенденцией к падению. В 2014 г. значение индекса приблизилось к среднему по региону, которое для всей алтайской популяции составляет  $14.6 \pm 0.46$ . Такие колебания могут указывать на включение в популяции механизмов регуляции по принципу обратных отрицательных

связей, которые, возможно, основаны на более значимой элиминации особей (или клеток) с высокой «массой» дополнительных хромосом. При этом остается непонятна причина длительного (более 20-летнего) увеличения числа и «индекса условной массы» Bs в популяции.

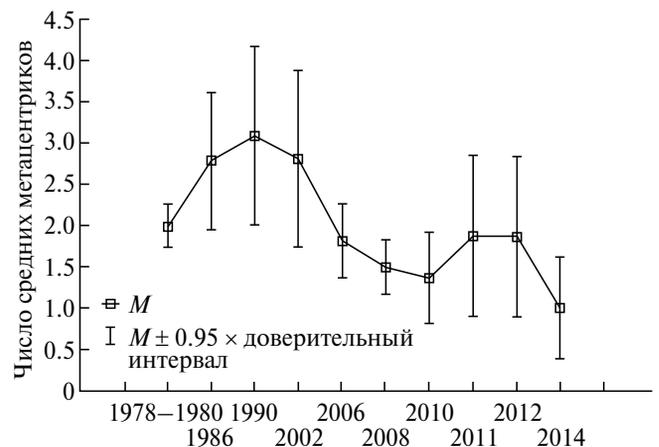
#### Динамика различных морфотипов (вариантов) Bs

Динамика морфотипов дополнительных хромосом за 36 лет наблюдений выглядела разнонаправленно. Например, среднее число крупных метацентриков в какой-то степени повторяло общую динамику среднего числа Bs (рис. 4), однако их количество в клетках относительно небольшое и очевидно оно не вносило определяющего вклад в общее число Bs (всего 19–28% от общего количества). Нужно сказать, что у этого вида крупные метацентрики встречаются достаточно редко (по нашим данным [3] только  $27,8 \pm 1,83\%$  от 598 исследованных особей по всему ареалу имеют эти хромосомы). Особенно редки они в популяциях Дальнего Востока [4].

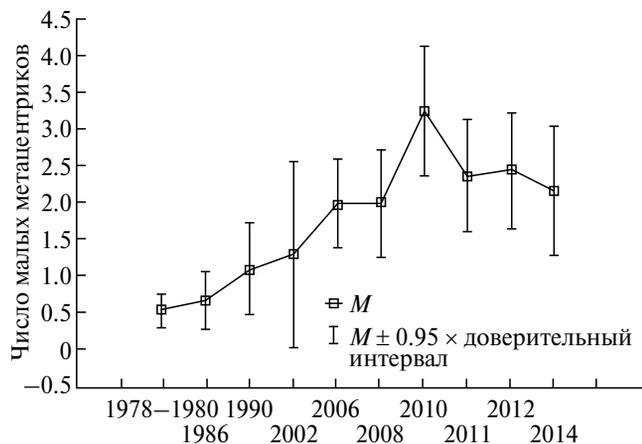
Второй морфотип дополнительных хромосом — *среднеразмерные* метацентрики, вносят основной вклад в суммарное количество Bs. Их доля в разные годы составляет от 20 до 64% от общего количества. Рост наблюдали в первый период динамики до 1990 г., что во многом определяло общий рост. Затем, их число и доля начали падать (рис. 5). Количество *мелких* метацентриков статистически росло до 2010 г. (рис. 6), затем упало и стабилизировалось на высоком уровне (средние в пределах 2.17–2.44) в последние годы (с 2011 по 2014). Таким образом отмеченная стабилизация в 2002–2012 гг. в большой степени является компромиссом разнонаправленных тенденций в динамике



**Рис. 4.** Динамика среднего числа ( $M$ ) крупных метацентриков (I класса Bs) у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в 1978–2014 гг.

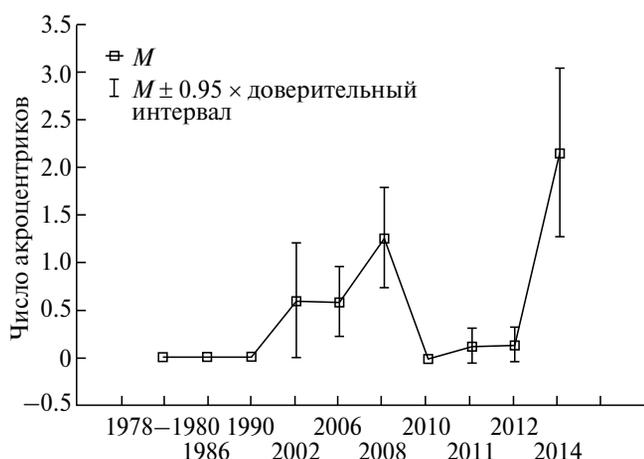


**Рис. 5.** Динамика среднего числа ( $M$ ) средних метацентриков (II класса Bs) у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в 1978–2014 гг.



**Рис. 6.** Динамика среднего числа ( $M$ ) мелких метацентриков (III класса  $Bs$ ) у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в 1978–2014 гг.

средних и мелких метацентриков: количество первых падало, а вторых росло. *Акроцентрики и точечные* микро- $B$ -хромосомы не вносят существенного вклада в общую динамику числа  $Bs$  (рис. 7 и 8). Их объединяет одна особенность – эти морфотипы дополнительных хромосом отсутствуют в исследуемой локальной популяции в периоде нарастания и относительно низких значений показателей общего количества  $Bs$ . Они начинают появляться в популяции на втором этапе динамики, когда рост числа  $Bs$  закончился на высоком уровне значений и стабилизировался. И все же в период стабилизации и начале спада их число в кариотипах было небольшим (суммарно не более 10%); интересно, что иногда они исчезали (2010 г.) в выборках и затем появлялись вновь. Похожая ситуация



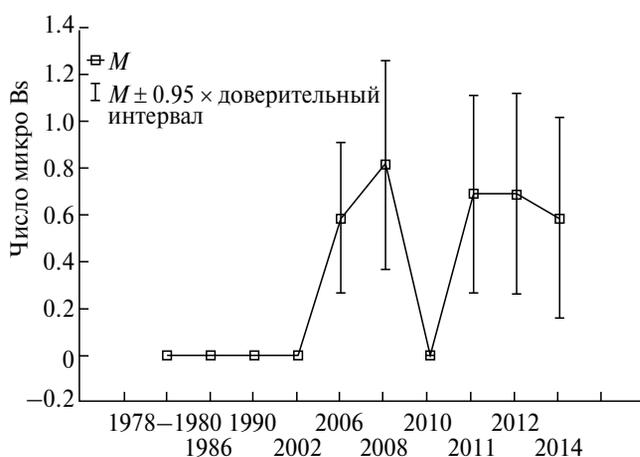
**Рис. 7.** Динамика среднего числа ( $M$ ) акроцентриков (IV класса  $Bs$ ) у *A. peninsulae* в популяциях северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в 1978–2014 гг.

с изменением количества акроцентриков и точечных микро- $B$ -хромосомы развивалась на южном берегу Телецкого озера (на расстоянии более 70 км) [20] – они отсутствовали на ранних этапах наблюдений (1980 г), когда среднее число  $Bs$  было низким, и появились (в небольшом количестве) после их увеличения в 1,6 раза (с 2.7 до 4.2) ( $p < 0.0001$ ) в 2011 г.

Интересно, что в популяциях Южного Прибайкалья, где как минимум 35 лет существует стабильная  $Bs$ -система, у зверьков всегда имеются микро- $B$ -хромосомы, причем их доля велика (72–76% от всех  $Bs$ ) [9]. В исследуемой популяции доля точечных хромосом составляет только 6.3% от всех  $Bs$  за все время наблюдений, а в периодах стабилизации и спада числа  $Bs$  она колеблется в пределах 9.0–11.8%.

#### Индекс стабильности – $IS$

По характеру динамики числа дополнительных хромосом разных морфотипов можно выделить две группы. В первую группу входят все метацентрики – крупные, средние и мелкие, они статистически, от года к году, изменяются умеренно, без резких колебаний, независимо от трека изменений. Диапазон значений их индексов  $IS$  компактен и находится в зоне умеренно-стабильного уровня динамики показателя (0.79–0.8, табл. 2). Вторая группа, в которую попадают относительно мелкие дополнительные хромосомы – акроцентрики и микро- $B$ -хромосомы, наоборот, имеют относительно низкую стабильность, а индексы находятся в зоне, характеризующей флуктуирующий тип динамики (табл. 2). Очевидно, что их появление в популяции только при высоких средних значениях числа  $Bs$  и



**Рис. 8.** Динамика среднего числа ( $M$ ) микро- $B$ -хромосом (V класса  $Bs$ ) у *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая в 1978–2014 гг.

**Таблица 2.** Индекс стабильности ( $IS \pm SE$ , [22]) динамики числа дополнительных хромосом разных морфотипов *A. peninsulae* в популяции северного региона Прителецкой тайги Горного Алтая (1978–2014 гг.)

Индекс	Метацентрики:			Акроцентрики	Микро-Bs
	крупные	средние	мелкие		
$IS \pm SE$	$0.80 \pm 0.04$	$0.80 \pm 0.05$	$0.79 \pm 0.05$	$0.35 \pm 0.18$	$0.43 \pm 0.20$

индекса *mB* как-то связано либо с ростом “«массивности»” дополнительных хромосом в клетках, либо с фактом стабилизации роста *Bs*.

#### Индекс разнообразия морфотипов

Для понимания структуры распределения дополнительных хромосом в популяции важно оценить закономерности изменения общего разнообразия В-хромосом в разные временные срезы. Наибольшее разнообразие морфотипов в популяции наблюдается в период стабилизации числа хромосом. В пределах этого отрезка времени (2002–2012 гг.) индекс разнообразия Животовского достигает очень высокого показателя –  $4.58 \pm 0.06$ . Причем это обусловлено не только присутствием в периоде стабилизации всех пяти морфотипов *Bs*, но и их повышенной долевым выравниванием. Наименьшее разнообразие наблюдается в периодах роста ( $2.74 \pm 0.17$ ), что объясняется присутствием в выборке только трех морфотипов – I, II и III класса метацентриков (acroцентриков и точечных хромосом не было), а также высоким уровнем доминирования среди них среднеразмерных метацентриков (62.1%), которые во многом определяли темп роста общего числа *Bs*. В период снижения числа дополнительных хромосом разнообразие было умеренным, ниже предшествующего ему периода стабилизации, но выше периода роста –  $3.8 \pm 0.28$ . Это было обусловлено, с одной стороны, присутствием в выборке только четырех морфотипов из пяти (отсутствовали акроцентрики), а с другой, – выраженным доминированием мелких метацентриков (44%). Все это свидетельствует о существенных перестройках в структуре распределения дополнительных хромосом в разные периоды изменений числа хромосом в локальной популяции за продолжительное время наблюдений. Кстати, в стабильных по *Bs* популяциях *A. peninsulae* Южного Прибайкалья [9] индекс разнообразия невелик (за все годы он равен  $2.7 \pm 0.04$ ). В популяции присутствуют все пять морфотипов *Bs*, однако низкий показатель разнообразия обусловлен высоким доминированием точечных хромосом (их доля более 70%).

Таким образом, в результате длительного, 36-летнего периода наблюдений за динамикой систем дополнительных хромосом в популяциях восточноазиатских мышей тайги северного побережья

Телецкого озера (Горный Алтай) удалось зафиксировать три периода динамики числа и условной “массы” *Bs*: рост, стабилизацию и спад. Различия между периодами статистически доказаны. На фоне других, в общем – то немногочисленных, многолетних популяционных наблюдений за этими загадочными структурами, показывающих относительную стабильность этих систем, впервые удалось показать их направленные изменения. Период длительного роста числа В-хромосом обнаружен только в популяциях восточноазиатских мышей Горного Алтая: на севере [8] и юге [20] Прителецкой тайги. Пока трудно сказать о наличии или отсутствии подобных явлений в других частях ареала или у других видов: слишком мало долгосрочных наблюдений.

На сегодняшний день остается малопонятным механизм изменения во времени системы *Bs* в популяциях мышей Горного Алтая (т.е. изменения соотношения морфотипов В-хромосом и их количества во временном ряду населения). В частности, нет объяснения механизму, определяющему выявленную направленность этого процесса в локальных популяциях Горного Алтая. Возможны две гипотезы. Первая может основываться на предположении, что появление в клетках новообразований происходит случайно и приводит к формированию разных вариантов систем *Bs*, а направленность этому процессу придает отбор (экзогенная направленность, обусловленная факторами отбора). Это вполне аналогично мутационному процессу и отбору в популяции. В этом случае нужно предположить наличие повышенной адаптивности мышей с определенными параметрами системы *Bs*. Такое предположение могло бы быть приемлемым объяснением в случае с популяциями, которые имеют стабильные параметры системы *Bs* и подвержены стабилизирующему отбору. Однако в нашем случае нужно объяснить движущий отбор, причем имеющий высокую селективность и соответственно скорость отбора (в период роста в течение 24 лет число *Bs* увеличивалось в среднем на 1.4 хромосомы в десятилетие, а в период стабилизации – вектор предполагаемого отбора вдруг резко изменился). Объяснить это имеющимися фактами достаточно трудно. Более того, в рамках этого предположения нельзя объяснить, почему в выборках разных периодов нередко отсутствует полный набор морфотипов *Bs*? В частности, на это указывает факт

отсутствия в выборках точечных хромосом и акроцентриков в период роста. Маловероятным кажется и влияние популяционного дрейфа на подобную динамику в связи с тем, что наличие схожих изменений (по крайней мере наличие направленного роста числа Bs) наблюдали фактически одновременно в двух локальных популяциях: на севере и на юге Телецкого озера, на расстоянии более 70 км друг от друга [20].

Второе объяснение наблюдаемой направленности процесса изменения Bs в популяциях Горного Алтая может быть результатом направленных изменений непосредственно в клетках. Некоторые косвенные факты поддерживают эту гипотезу. Например, наличие определенных черт регуляции по принципу обратных отрицательных связей: вначале происходит наращивание «массы» В-хромосом до максимальных показателей для вида, а затем ее стабилизация и спад. Предположения о том, что максимальные «массы» дополнительных хромосом критичны для жизнедеятельности, обсуждались в данной статье выше и в других работах [2, 3, 7, 11]. Возможно, что наращивание числа Bs и их «массы» как-то связано с изменением соотношения морфотипов в процессе выявленной динамики. На это же указывает разнонаправленные динамики и отсутствие части морфотипов Bs в период роста их числа.

Такие колебания могут указывать на включение механизмов регуляции по принципу обратных отрицательных связей, которые, возможно, основаны на более значимой элиминации клеток (или особей) с высокой «массой» дополнительных хромосом. При этом остается непонятна причина длительного (более 20-летнего) увеличения числа и «индекса условной массы» Bs в популяции.

Предположительно возникновение В-хромосом, по мнению Н.Б. Рубцова с соавт. [11, 14], происходит из небольшого числа конкретных А-хромосом. Замечено, что Bs чаще встречаются у млекопитающих с акроцентрическими хромосомами [29–31]. Высокая частота встречаемости изохромосом среди Bs указывает на существование в их прицентромерных районах горячих точек хромосомных перестроек, которые, вероятно, присутствуют и в предковых А-хромосомах. Это подтверждается классическими методами дифференциальной окраски [32] и с использованием метода FISH [14, 33, 34]. Возможно, в разных популяциях *A. peninsulae* эти горячие точки локализованы в разных А-хромосомах. Это подтверждают данные об отличиях состава ДНК прицентромерных районов В-хромосом мышей из Приморья и Западной Сибири [14, 33].

Частота разрыва хромосом в горячих точках и их последующая амплификация обуславливают разное соотношение числа и морфотипов

В-хромосом. Для объяснения изменений числа и морфологии дополнительных хромосом Н.Б. Рубцов и Ю.М. Борисов [14] предполагают влияние следующих факторов: 1) изменение скорости увеличения В-хромосом в результате амплификации ДНК; 2) изменение числа и состава морфотипов В-хромосом в процессе мейотического драйва; 3) изменение частоты перестроек В-хромосом и, как следствие, изменение их морфологии; 4) изменение частоты формирования В-хромосом из предковой А-хромосомы. Такой механизм, на наш взгляд, должен приводить к обязательному присутствию в клетках точечных хромосом как начального этапа их модификаций. Действительно, в восточных популяциях они имеются всегда и их доля велика [3, 9]. Однако в нашем случае, как раз они отсутствуют при низких значениях числа Bs и в период их роста. Для объяснения этого можно предположить, что их появление и дальнейшая амплификация ДНК различных районов В-хромосом происходят быстро, без замедления. Возможно, все эти изменения являются элементами эгоистического поведения ДНК. Так или иначе речь идет о направленной дестабилизации генома.

Неясна причина возникновения изменений, является ли это результатом воздействия внешних факторов на организмы или это эндогенные (внутриорганизменные или внутриклеточные) изменения.

Трудно что-либо убедительно высказать о причинах роста числа В-хромосом в популяциях Горного Алтая на период последней четверти XX в.. На данный момент высказывалось несколько предположений: влияние остатков гептила (НдМГ-несимметричного демитилгидразина), сохранившегося в отработанных ракетных ступенях космических кораблей, которые технически сбрасываются в районе Горного Алтая, а также влияние вирусного мутагенеза на хромосомный аппарат мышей [8, 20]. Первая гипотетическая причина не дает ответа на вопрос: почему в 2002 г. рост остановился и наступила стабилизация. Кроме того, нет информации о концентрации гептила и его производных в местах обитания мышей. Нет убедительных доказательств и вирусного происхождения направленного роста. Предположение о влиянии вирусных инфекций на возможность дестабилизации генома, вызванного увеличением частоты разрывов в горячих точках перестроек А-хромосом, уже высказывалось в литературе [14], однако в нашем случае, это может быть только предположением.

Очевидно, что для дальнейшего понимания долговременных изменений кариотипов восточноазиатских мышей в регионе, необходимо продолжить наблюдения.

Авторы выражают благодарность директору Института систематики и экологии СО РАН

члену-корр. В.В. Глупову и заместителю директора, д.б.н. Ю.Н. Литвинову за оказанное содействие в организации работ на Телецком стационаре, также к.б.н. С.А. Абрамову за помощь в отлове мышей.

Все эксперименты на мышах проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986). Материал был собран и обработан до организации комитетов по биоэтике, протокол работы был одобрен Биоэтическим комитетом ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН (протокол №1, 2017-03-17).

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. *Vujošević, M.; Blagojević, J.* В chromosomes in populations of mammals // *Cytogenet Genome Res.* 2004. V. 106. P. 247–256.  
<https://doi.org/10.1159/000079253>
2. *Vujosevic M., Rajicic M., Blagojevic J.* В Chromosomes in populations of mammals revisited // *Genes.* 2018. V. 9 (10). P. 110–136.
3. *Borisov Yu.M., Zhigarev I.A.* В Chromosome System in the Korean Field Mouse *Apodemus peninsulae* Thomas 1907 (Rodentia, Muridae) // *Genes.* 2018. V. 9 (10). P. 147–158.  
<https://doi.org/10.3390/genes9100472>
4. *Рослик Г.В., Картавцева И.В.* Изменчивость морфотипов добавочных хромосом и появление микро-В-хромосом в кариотипе *Apodemus peninsulae* (Rodentia) на Дальнем Востоке России // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 7. С. 789–803.  
<https://doi.org/10.31857/S0016675823070093>
5. *Blagojević J., Malkov S., Rajičić M., et al.* Variation in the frequency of B chromosomes in small isolated populations of *Apodemus flavicollis* // *BMC Proceedings.* 2023. V. 17 (Suppl 20). P. 6.: S2O2.  
<https://doi.org/10.1186/s12919-023-00284-9>
6. *Zhigarev I.A., Borisov Y.* Different populations of *Apodemus peninsulae* in Siberia (Russia) show different degree of stability of Bs systems: Results of 36 years of observations // *BMC Proceedings.* 2023. V. 17 (Suppl 20). P. 7.: S2-P2.  
<https://doi.org/10.1186/s12919-023-00284-9>
7. *Гилева Э.А.* Система В-хромосом у копытных леммингов *Dicrostonyx torquatus* Pall., 1779 из природных и лабораторных популяций // *Генетика.* 2004. Т. 40. № 12. С. 1686–1694.
8. *Борисов Ю.М.* Процесс увеличения числа и вариантов системы В-хромосом мышей *Apodemus peninsulae* в популяции Горного Алтая за 26-летний период // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 9. С. 1227–1237.
9. *Жигарев И.А., Крищук И.А., Борисова З.З., Борисов Ю.М.* Стабильность популяционной системы В-хромосом корейской мыши *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) в южном Прибайкалье: 35 лет наблюдений // *Генетика.* 2022. Т. 58. № 5. С. 562–569.  
<https://doi.org/10.31857/S0016675822050125>
10. *Картавцева И.В.* Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002. 142 с.
11. *Рубцов Н.Б., Борисов Ю.М., Карамышева Т.В., Бочкарев М.Н.* Механизмы возникновения и эволюции В-хромосом у восточноазиатских мышей *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) // *Генетика.* 2009. Т.45. № 4. С. 449–457.
12. *Рубцов Н.Б., Картавцева И.В., Рослик Г.В. и др.* Особенности В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* (Thomas, 1906) Забайкалья и Дальнего Востока, выявленные FISH методом // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 3. С. 341–350.  
<https://doi.org/10.7868/S001667581503011X>
13. *Борисов Ю.М., Мышлявкина Т.А.* В-хромосомы // *Успехи соврем. биологии.* 2018. Т. 138. С. 336–351.
14. *Rubtsov N.B., Borisov Yu.M.* Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes // *Genes.* 2018. V. 9 (10). P. 91–109.  
<https://doi.org/10.3390/genes9100490>
15. *Vujošević M.* В-chromosome polymorphism in *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) during five years // *Caryologia.* 1992. V. 45. P. 347–352.  
<https://doi.org/10.1080/00087114.1992.10797237>
16. *Wójcik J.M.; Wójcik A.M., Macholán M. et al.* The mammalian model for population studies of B chromosomes: the wood mouse (*Apodemus*) // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P. 264–270.  
<https://doi.org/10.1159/000079297>
17. *Бекасова Т.С., Воронцов Н.Н.* Популяционный хромосомный полиморфизм азиатских лесных мышей *Apodemus peninsulae* // *Генетика.* 1975. Т. 11. № 6. С. 89–94.
18. *Bekasova T.S., Vorontsov N.N., Korobitsyna K.V., Korablev V.P.* В-chromosomes and comparative karyology of the mice of the genus *Apodemus* // *Genetica* 1980. V. 52–53. P. 33 – 43.
19. *Blagojević J., Vujosević M.* The role of B chromosomes in the population dynamics of yellow-necked wood mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) //

- Genome. 1995. V. 38. P. 472–478.  
<https://doi.org/10.1139/g95-062>
20. *Borisov Y.M., Abramov S.A., Borisova M.Y., Zhigarev I.A.* The occurrence of dot-like micro B chromosomes in Korean field mice *Apodemus peninsulae* from the shore of the Teletskoye Lake (Altai Mountains) // *Comparative Cytogenet.* 2020. V. 14. N. 1. P. 97–105.  
<https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v14i1.47659>
  21. *Орлов В.Н.* Кариосистематика млекопитающих: цитогенетические методы в систематике млекопитающих. М.: Наука, 1974. 206 с.
  22. *Борисов Ю.М.* Система В-хромосом – маркер популяций *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) в Прибайкалье. *Генетика.* 1990. Т. 26. № 12. С. 2215–2224.
  23. *Борисов Ю.М.* Цитогенетическая дифференциация популяций восточноазиатской мыши в Восточной Сибири. *Генетика.* 1990. Т. 26. № 10. С. 1828–1839.
  24. *Zhigarev I.A.* Estimation of population size stability in small mammals // *Dokl Biol Sci.* 2005. V. 403. P. 306–309.  
<https://doi.org/10.1007/s10630-005-0120-z>
  25. *Животовский Л.А.* Показатель внутривидового разнообразия // *Журн. общей биологии.* 1980. Т. 41. № 6. С. 828–836.
  26. *Животовский Л.А.* Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
  27. *Рослик Г.В., Картавецва И.В.* Морфотипы В-хромосом *Apodemus peninsulae* (Rodentia) Дальнего Востока России // *Цитология.* 2012. Т. 54. № 1. С. 66–77.
  28. *Борисов Ю.М., Жигарев И.А., Шефтель Б.И.* В-хромосомы восточноазиатских мышей (*Apodemus peninsulae* Thomas, 1907 (Rodentia, Muridae)) на восточных склонах Цинхай-Тибетского плато (КНР) // *Генетика.* 2020. Т. 56. № 10. С. 1184–1188.  
<https://doi.org/10.31857/S0016675820090039>
  29. *Palestis B.G., Trivers R., Burt A., Jones R.N.* The distribution of B chromosomes across species // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P. 151–158.  
doi: 10.1111/j.0014-3820.2005.tb01035.x
  30. *Levin D.A., Palestis B.G., Jones R.N., Trivers R.* Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms // *Evolution.* 2005. V. 59. P. 962–969.  
<https://doi.org/10.1159/000079281>
  31. *Trivers R., Burt A., Palestis B.G.* B chromosomes and genome size in flowering plants // *Genome.* 2004. V. 47. P.1–8.  
<https://doi.org/10.1139/g03-088>
  32. *Борисов Ю.М.* Популяционная цитогенетика грызунов (Mammalia. Rodentia) // *Итоги науки и техники. Общая генетика.* М.: ВИНТИ, 1981. Т. 7. С. 79–152.
  33. *Rubtsov N.B., Karamysheva T.V., Andreenkova O.V. et al.* Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P.289–294.  
<https://doi.org/10.1159/000079301>
  34. *Rubtsov N.B., Kartavtseva I.V., Roslik G.V. et al.* Features of the B chromosome in Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Thomas, 1906) from Transbaikalia and the Far East identified by the FISH method. // *Russ. J. Genet.* 2015. V. 51. № 3. P. 278–288.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795415030114>

## Dynamic of the B Chromosome's System in the Population of the Korean Field Mouse *Apodemus Peninsulae* (Mammalia, Rodentia) from the Northern Region of the Teletskaya Taiga of Altai Mountains Over a 36-Year Period

I. A. Zhigarev<sup>1, \*</sup>, Yu. M. Borisov<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Moscow Pedagogical State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Science, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: i.zhigarev@gmail.com

\*\*e-mail: boriss-spb@yandex.ru

The process of changes of the number and morphology of B-chromosomes in the populations of mice (*Apodemus peninsulae*) in the northern region of the Teletskaya taiga of Altai Mountains: over a 36-year period (1978–2014) was traced. Three time's phases can be distinguished. From 1978 to 2002 (24 years) – a phase of steady growth in the number of B chromosomes, with a relatively uniform average increase of 1.4 chromosomes per decade (from  $3.17 \pm 0.2$  to  $6.5 \pm 0.54$ ). The stabilization's phase of the indicator in a narrow range of 6.3–6.9 (2002–2012), but at more than a twofold high level compared to the beginning of the 1980s (differences are significant) and the period (2012–2014) of the emerging trend towards a decrease in the number of additional chromosomes (differences are also significant). The change in the index of the conditional mass of B chromosomes (mB) also has similar dynamics, and during the period of stabilization it was at its maximum for the species. The dynamics of different types of B-chromosomes shows an unequal contribution to the overall dynamics. The main contribution is made by macro-B-metacentrics. Micro-B-chromosomes and acrocentrics are absent in the growth phase and appear in the stabilization phase at the maximum of other indicators.

**Keywords:** *Apodemus peninsulae*, B chromosome dynamics, Bs, karyotype.

## ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫМИ СИСТЕМАМИ В ГИПОТАЛАМУСЕ САМЦОВ МЫШЕЙ

© 2024 г. И. Л. Коваленко<sup>1,\*</sup>, А. Г. Галямина<sup>1</sup>, Д. А. Смагин<sup>1</sup>, Н. Н. Кудрявцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: koir0909@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации 15.01.2024 г.

Хронический социальный стресс, вызванный повторным негативным опытом в агонистических взаимодействиях, вызывает формирование депрессивноподобного состояния у самцов мышей. Цель исследования – изучить изменения экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в метаболизме, рецепции, транспорте катехоламинов, опиоидов, глутамата и ГАМК, в гипоталамусе под влиянием хронического социального стресса. Образцы гипоталамуса были секвенированы методом RNA-Seq. Было показано, что экспрессия катехоламинергических генов *Adra1b*, *Adrbk1*, *Comtd1*, *Ppp1r1b*, *Sncb*, *Sncg* и *Th* у животных с депрессивноподобным состоянием повышается, а экспрессия генов *Maoa* и *Maob* снижается. Экспрессия опиоидергических и каннабиноидергических генов *Pdyn*, *Penk*, *Pomc*, *Pnoc*, *Ogfr* и *Faah* была повышена, в то время как, экспрессия генов *Oprk1*, *Opcml*, *Ogfrl1* и *Cnr1* снижена. Экспрессия глутаматергических генов *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*, *Grin1*, *Grm2* и *Grm4* повышается, а генов *Gria3*, *Grik1*, *Grik2*, *Grin2a*, *Grin3a*, *Grm5*, *Grm8* и *Gad2* снижается по сравнению с контрольными животными. Экспрессия ГАМКергических генов *Gabre*, *Gabbr2* и *Slc6a11* была выше, а генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, и *Slc6a13* была ниже у животных с депрессивноподобным состоянием. Анализ полученных данных позволяет предположить, что продукты генов, через которые осуществляются взаимосвязи с другими нейротрансмиттерными системами (*Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1* и *Pdyn*), могут представлять интерес в качестве потенциальных мишеней для фармакологической коррекции последствий хронического социального стресса.

**Ключевые слова:** гипоталамус, хронический социальный стресс, депрессия, гены нейротрансмиттерных систем, RNA-Seq.

DOI: 10.31857/S0016675824060047 EDN: BXZTVB

Стресс, вызванный повторным опытом поражений в межсамцовых конфронтациях, вызывает формирование депрессивноподобного состояния у самцов мышей (далее депрессивные животные) [1, 2], сходного по всем критериям с данной патологией у человека. При развитии депрессивного состояния в мозге животных обнаружены изменения в активности многих нейротрансмиттерных систем. Так, у депрессивных животных отмечается снижение уровня серотонина (5-НТ) и/или его основного метаболита 5-ГИУК. Кроме того, снижается активность

триптофангидроксилазы, которая играет главную роль в синтезе серотонина [2–4], а также наблюдается снижение экспрессии серотонергических генов *Tph2*, *Sert* (*Slc6a4*), *MaoA*, *5-HT1a* [5], кодирующих триптофангидроксилазу, серотониновый транспортер, моноаминоксидазу А и серотониновые рецепторы первого типа, соответственно. У животных после хронического социального стресса были отмечены изменения в уровне дофамина в разных отделах головного мозга [2, 6, 7]. В целом результаты свидетельствовали о гипофункции дофаминергической и серотонергической

систем, развившейся под влиянием длительно-го социального стресса у самцов мышей [2]. Также данные литературы свидетельствуют о том, что тревожные расстройства и депрессия могут приводить к дисбалансу между глутаматергическим возбуждением и ГАМКергическим торможением в лимбических областях [8, 9]. Однако выраженность изменений показателей нейротрансмиттеров зависит от длительности социального стресса и отдела головного мозга. Согласно литературным данным, при депрессии также показана дисрегуляция эндогенной опиоидергической системы [10]. В постмортальных образцах мозга депрессивных больных и на лабораторных моделях у животных обнаружена повышенная экспрессия генов эндогенных опиатов и показан их продепрессивный эффект [11–13]. Так, можно наблюдать активацию предшественников опиатов при сниженной экспрессии рецепторов, что может свидетельствовать о снижении реакции на опиоиды. Таким образом, многие экспериментальные и клинические исследования подтверждают, что под влиянием хронического социального стресса в мозге животных обнаружены изменения в активности многих нейротрансмиттерных систем [14–17].

Хорошо известно участие гипоталамуса в регуляции стресса, процессах выработки гормонов, участвующих в координации различных физиологических функций и психоэмоциональных состояний. Кроме того, из наших предыдущих данных было известно, что наибольшее количество всех дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) наблюдалось именно в этой области, что может отражать вовлечённость гипоталамуса в развитие реакции на социальный стресс. Поэтому целью исследования было изучить изменения экспрессии генов кодирующих белки, участвующие в метаболизме, рецепции, транспорте катехоламинов, опиоидов, глутамата и ГАМК, в гипоталамусе (ГПТ) самцов мышей под влиянием хронического социального стресса. Также мы планировали обнаружить возможные функциональные взаимосвязи между ДЭГ разных нейротрансмиттерных систем и выделить гены, являющиеся потенциальными связующими звеньями между ними.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Работа была выполнена на самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 10–12 недель и массой тела 26–28 г. Эксперимент проводили в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН в стандартных условиях со световым режимом свет/темнота – 12/12 ч. Сухой лабораторный корм и вода у животных были в свободном доступе. Все процедуры проводились

в соответствии с международными правилами проведения экспериментов с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes).

Хронический социальный стресс вызывали у самцов мышей повторным опытом социальных поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях [1, 18]. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое воздействие. Ежедневно во второй половине дня убирали перегородку, что приводило к агонистическим взаимодействиям. Во время первых двух–трех дней тестов выявляли победителей и особей, терпящих поражения при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время столкновений длились более трех минут, устанавливая между ними перегородку. В других ситуациях тест продолжался 10 мин. После трех недель у самцов с повторным опытом социальных поражений развивается депрессивноподобное состояние [2, 19, 20], удовлетворяющее всем критериям, принятым для диагностирования на моделях депрессии: сходство этиологического фактора, симптоматики, чувствительности к антидепрессантам, и нейрохимическим изменениям, наблюдаемым у пациентов с диагнозом депрессия.

Для транскриптомного анализа отбирали животных (из количества 12 особей в группе) с наиболее выраженными признаками патологии поведения. Животные были декапитированы на следующий день после последней конфронтации одновременно с контрольными особями. Отделы мозга извлекались одним исследователем в соответствии с анатомическим атласом мозга (Allen Mouse Brain Atlas; <http://mouse.brainmap.org/static/atlas>). Все образцы помещались в раствор RNAlater (Life Technologies, США) и хранились при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до секвенирования. В эксперименте были исследованы две группы животных: 1) самцы с депрессивноподобным состоянием, потерпевшие социальные поражения в течение 20 дней агонистических взаимодействий; 2) контрольные животные – особи без последовательного опыта агонистических взаимодействий.

**RNA-Seq анализ.** Анализ проб выполнялся в ООО “Геноаналитика” (<http://genoanalytica.ru>, Москва) методом RNA-Seq, используя не менее 20 млн прочтений ДНК для каждого образца. Все

образцы секвенировались отдельно. мРНК экстрагировали с использованием кита Dynabeads RNA Purification Kit (Ambion, США). Библиотеки кДНК были сконструированы с использованием протокола производителя NEBNext для Illumina (NEB E7770, New England Biolabs, Inc., Ипсвич, Массачусетс, США). Секвенирование библиотек кДНК было выполнено на платформе Illumina HiSeq 1500 (Illumina Sequencing, США). Картирование полученных ридов (прочтений) ДНК из файлов в формате fastq на референсный геном мыши GRCm38.p3 выполнялось с помощью программы TopHat. Пакет программ Cufflinks/Cuffdiff был использован для того, чтобы оценить уровень экспрессии транскриптов в единицах FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) и выявить ДЭГ. Только аннотированные гены были взяты для последующего анализа. Дифференциально экспрессирующимися считали гены, уровень экспрессии которых статистически значимо различался у контрольных и депрессивных мышей ( $p < 0.05$ ). Решение о статистически значимых различиях экспрессии принималось также с использованием поправки на множественные сравнения ( $q$ -значения – скорректированные  $p$ -значения по методу Беньямини–Хохберга (FDR)). В каждой группе было проанализировано по три животных.

*Базы данных и функциональная аннотация ДЭГ.* Для анализа гены нейротрансмиттерных систем (катехоламинергических, опиоидергических, глутаматергической и ГАМКергической) отбирались по базе данных генов человека (The Human Gene Database, <http://www.genecards.org/>), онлайн каталогу генов человека и генетических болезней (OMIM, <http://omim.org/>), базе данных болезней человека (MalaCards, <http://www.malacards.org>). Далее в результатах представлены отобранные и исследованные гены, у которых обнаружены статистически значимые изменения экспрессии (ДЭГ). Для исследования взаимодействия белков использовали базу данных STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <http://string-db.org>). Использовались также ресурсы базы данных литературы PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *ДЭГ катехоламинергических систем*

Были исследованы следующие гены, относящиеся к катехоламинергическим системам: *Th*, *Ddc*, *Dbh*, *Maoa*, *Maob*, *Comt*, *Ppp1r1b*, *Slc6a3*, *Slc6a2*, *Slc18a2*, *Drd1*, *Drd2*, *Drd3*, *Drd4*, *Drd5*, *Adra1a*, *Adra1b*, *Adra1d*, *Adra2a*, *Adra2b*, *Adra2c*, *Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*, *Snca*, *Sncb*, *Sncg*, *Adrbk1*, *Adrbk2*.

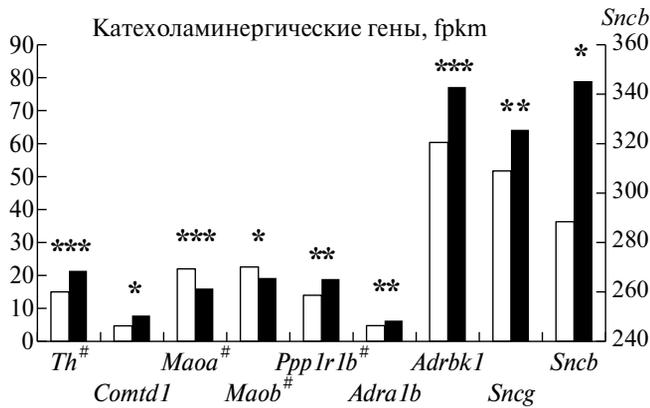
Из них у депрессивных животных изменилась экспрессия девяти генов (рис. 1). Уровень экспрессии генов *Adra1b* ( $p = 0.002$ ,  $q = 0.015$ ), *Adrbk1* ( $p < 0.001$ ,  $q = 0.006$ ), *Comtd1* ( $p = 0.048$ ), *Ppp1r1b*# ( $p = 0.006$ ,  $q = 0.034$ ), *Sncb* ( $p = 0.021$ ), *Sncg* ( $p = 0.007$ ,  $q = 0.037$ ) и *Th*# ( $p < 0.001$ ,  $q < 0.001$ ) был повышен. У генов *Maoa*# ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ) и *Maob*# ( $p = 0.034$ ) экспрессия была снижена по сравнению с контролем.

В нашем эксперименте происходит активация катехоламинергических систем у депрессивных животных, что подтверждается повышением экспрессии генов *Th*, *Adra1b*, *Adrbk1*, *Comtd1*, *Snca*, *Sncb*, а также гена *Ppp1r1b*, что может являться следствием реакции на стрессорное воздействие. Увеличение экспрессии гена *Th* у таких животных может свидетельствовать об активации синтеза дофамина и норадреналина в ГПТ. В зависимости от длительности стрессорного воздействия тирозингидроксилаза может активироваться как в синем пятне головного мозга, так и в надпочечниках, но эти эффекты опосредованы различными транскрипционными факторами [22, 23].

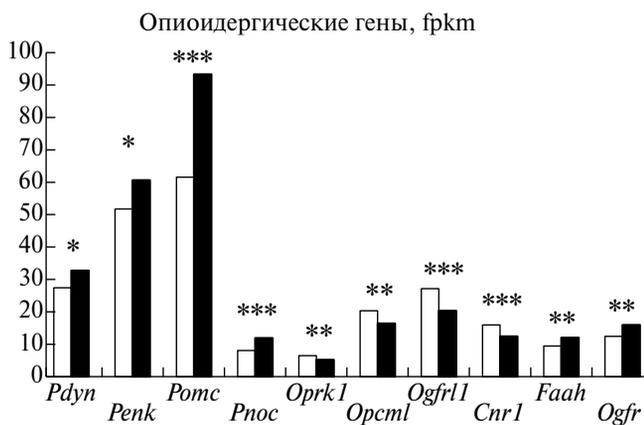
Ранее в нашей лаборатории было проанализировано изменение экспрессии серотонергических генов, кодирующих белки, которые вовлечены в синтез, инактивацию, рецепцию серотонина, а также генов, кодирующих транскрипционные и нейротрофические факторы в пяти отделах головного мозга самцов мышей с тревожно-депрессивным расстройством [24].

Подробный транскрипционный анализ показал, что в ГПТ у депрессивных самцов была снижена экспрессия генов *Maoa*, *Maob* (эти гены считаются общими для серотонергической и катехоламинергических систем) и *Creb1*, и повышена экспрессия генов *Htr6* и *Aldh1b1*. Таким образом, снижение экспрессии генов *Maoa* и *Maob*, кодирующих ферменты катаболизма катехоламинов, и при этом повышение экспрессии гена *Aldh2*, который кодирует альдегид-дегидрогеназу 2, в ГПТ могут свидетельствовать о возможной активации катаболизма дофамина, а также о снижении процессов разрушения и более длительном действии норадреналина.

Также нами было обнаружено изменение экспрессии генов, кодирующих синуклеины – белки, которые регулируют синтез моноаминов, их хранение в везикулах и высвобождение в синапсе [25], а также обратный захват из синаптической щели [26]. Так, в ГПТ было показано увеличение экспрессии генов *Sncb* и *Sncg*. Хотя в других отделах головного мозга на используемой модели изменения экспрессии генов синуклеинов имели разнонаправленный характер. Так, например, в гиппокампе было показано увеличение экспрессии гена



**Рис. 1.** Экспрессия ДЭГ катехоламинергических систем в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. контроль. Для гена *Sncb* представлена вспомогательная шкала. Данные выражены в единицах ФРКМ. # – ранее опубликованные данные [21].



**Рис. 2.** Экспрессия ДЭГ опиоидергических и каннабиноидной систем в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. контроль. Данные выражены в единицах ФРКМ.

*Sncb*, в стриатуме – снижение экспрессии гена *Sncb* и увеличение экспрессии *Sncb*, в вентральной тегментальной области и ядрах шва среднего мозга произошло снижение экспрессии гена *Sncg* [27]. Роль  $\alpha$ -синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона и других заболеваний человека, известных как  $\alpha$ -синуклеинопатии, хорошо известна. В частности, есть данные об участии альфа-синуклеина в развитии депрессии у людей [28]. Участие двух других членов семейства синуклеинов,  $\beta$ -синуклеина и  $\gamma$ -синуклеина, при депрессии изучено мало. Однако есть данные, что они вовлечены в

процессы нейродегенерации. При этом показано, что альфа-синуклеин и бета-синуклеин обладают противоположными эффектами [29], и гамма-синуклеин может быть вовлечен в нейрорепаративные изменения и гибель восприимчивых нейронов.

#### ДЭГ опиоидергических и каннабиноидной систем

Из генов опиоидергической и каннабиноидной систем были исследованы следующие гены: *Oprm1*, *Oprd1*, *Oprk1*, *Cnr1*, *Cnr2*, *Penk*, *Pdyn*, *Pnoc*, *Pomc*, *Ogfr*, *Ogfr1*, *Opclm1*, *Faah*.

У депрессивных животных изменилась экспрессия, у 10 из исследованных генов (рис. 2). Среди генов опиоидергических и каннабиноидной систем повысилась экспрессия генов *Faah* ( $p = 0.004$ ,  $q = 0.024$ ), *Pdyn* ( $p = 0.022$ ), *Penk* ( $p = 0.048$ ), *Pnoc* ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.001$ ), *Pomc* ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.001$ ), *Ogfr* ( $p = 0.002$ ,  $q = 0.012$ ). При этом была снижена экспрессия генов *Cnr1* ( $p < 0.001$ ,  $q < 0.01$ ), *Ogfr1* ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.002$ ), *Opclm1* ( $p = 0.005$ ,  $q = 0.029$ ), *Oprk1* ( $p = 0.007$ ,  $q = 0.038$ ) по сравнению с контрольными животными.

Известно, что длительный прием опиатов может вызывать симптомы депрессии у людей [30, 31]. Кроме того, при депрессии отмечается дисрегуляция эндогенной опиоидергической системы [10]. В настоящем исследовании мы обнаружили увеличение экспрессии генов *Penk*, *Pdyn*, *Pnoc* и *Pomc*, кодирующих белки-предшественники эндогенных опиатов. При этом полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными, согласно которым повышенная экспрессия генов эндогенных опиатов наблюдается в посмертных образцах мозга депрессивных больных, либо показан их продепрессивный эффект в лабораторных моделях [11–13]. Таким образом, мы можем видеть активацию предшественников опиатов при сниженной экспрессии рецепторов, что может свидетельствовать о снижении реакции на опиоиды.

Также была увеличена экспрессия гена *Faah*, кодирующего гидролазу амидов жирных кислот, и гена *Ogfr*, кодирующего рецептор опиоидного фактора роста. Согласно базе данных GeneCards, заболевания, связанные с ФААН, включают полинаркоманию и зависимость от каннабиса. При этом данные относительно участия ФААН в механизмах депрессии противоречивы. С одной стороны, генетическая предрасположенность к депрессии связывается с низкой активностью этого фермента [32], с другой стороны, для ее ингибитора показан антидепрессивный эффект [33]. Ген *Ogfr*, как правило, не рассматривается с точки зрения его участия в развитии депрессии, для него более изучено вовлечение в механизмы формирования аддиктивных состояний, в иммунные процессы и

механизмы канцерогенеза, в частности с усилением аутоиммунной активности, что нетипично для животных с депрессивноподобным поведением.

Также мы обнаружили снижение экспрессии генов *Cnr1*, *Ogfr1*, *Opcml*, *Oprk1*, кодирующих каннабиноидный рецептор, рецептор опиоидного фактора роста, белок, связывающий опиоиды/молекула клеточной адгезии, каппа опиоидный рецептор первого типа, соответственно. Снижение экспрессии опиоидергических рецепторов возможно является компенсаторной реакцией на сенситизацию, развивающуюся в ответ на усиление экспрессии эндогенных опиатов. В то же время известно, что полиморфизм по генам *Cnr1* и *Oprk1* связан с выраженностью депрессии у людей [34–36]. Что касается гена *Opcml*, то для него существуют данные, свидетельствующие о связи полиморфизма с развитием депрессии [37], но в целом его роль в развитии этого заболевания не исследована. Таким образом, наши результаты как подтверждают известные ранее данные об активации опиоидергических систем при депрессии, так и выявляют новые опиоидные гены для дальнейшего исследования их роли в развитии этой патологии. Однако необходимо учесть, что эти изменения наблюдаются в ГПТ, в то время как в других отделах мозга в зависимости от основной функции показатели нейрогеномных изменений могут различаться.

#### ДЭГ глутаматергической системы

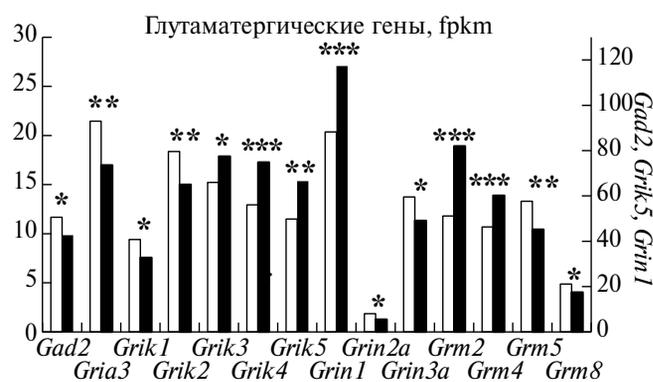
Из генов глутаматергической системы были исследованы гены: *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Gria4*, *Grik1*, *Grik2*, *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*, *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Grin2d*, *Grin3a*, *Grin3b*, *Grm1*, *Grm2*, *Grm3*, *Grm4*, *Grm5*, *Grm6*, *Grm7*, *Grm8*, *Slc17a6*, *Slc17a7*, *Slc17a8*, *Grid1*, *Grid2*, *Grid2ip*, *Gad1*, *Gad2*.

У депрессивных животных в ГПТ изменилась экспрессия 14 генов (рис. 3). Среди них оказалась повышенной экспрессия генов *Grik3* ( $p = 0.029$ ), *Grik4* ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.004$ ), *Grik5* ( $p = 0.003$ ,  $q = 0.017$ ), *Grin1* ( $p = 0.0006$ ,  $q = 0.006$ ), *Grm2* ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ), *Grm4* ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.006$ ) и была снижена экспрессия у генов *Gria3* ( $p = 0.005$ ,  $q = 0.031$ ), *Grik1* ( $p = 0.018$ ), *Grik2* ( $p = 0.013$ ,  $q = 0.059$ ), *Grin2a* ( $p = 0.038$ ), *Grin3a* ( $p = 0.045$ ), *Grm5* ( $p = 0.003$ ,  $q = 0.020$ ), *Grm8* ( $p = 0.035$ ), *Gad2* ( $p = 0.021$ ).

В литературе показано, что глутаматергическая система вовлечена в развитие тревожного и депрессивного поведения. Так, в некоторых работах описывают антидепрессивный эффект агонистов AMPA-рецепторов [38], в то время как анксиолитическое действие показано для их антагонистов [39, 40]. В нашем исследовании мы обнаружили снижение экспрессии гена *Gria3*, кодирующего 3 субъединицу ионотропного

AMPA-рецептора, что хорошо согласуется с литературными данными о том, что у нокаутов по гену AMPA-рецептора можно наблюдать депрессивноподобное состояние [41]. Среди генов глутаматергической системы у животных с депрессивноподобным состоянием была повышена экспрессия гена *Grin1* и сниженной у генов *Grin2a* и *Grin3a*, кодирующих 1, 2A, 3A субъединицы ионотропного NMDA-рецептора. Согласно литературным данным, на лабораторных моделях животных, только для полных агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов показано, что они могут проявлять как антидепрессивный [42], так и анксиолитический эффекты [43, 44]. Известно, что под влиянием хронического социального стресса происходит длительная активация глутаматергических NMDA-рецепторов [45], что хорошо согласуется с нашими данными по гену *Grin1*. У животных с тревожно-депрессивным поведением увеличивается экспрессия генов *Grm2* и *Grm4*, кодирующих метаботропные рецепторы 2, 4 подтипов, в гиппокампе [46], как и у наших животных с депрессивноподобным состоянием в ГПТ.

В целом, хотя и показаны изменения экспрессии глутаматергических генов при депрессии, механизмы участия белков, кодируемых этими генами, пока мало изучены. Анализ ДЭГ в нашем исследовании с использованием базы данных STRING (<http://string-db.org/>) позволяет предположить, что основную роль в нарушении баланса между нейротрансмиттерными системами под влиянием хронического социального стресса могут играть ионотропные NMDA-рецепторы.



**Рис. 3.** Экспрессия ДЭГ глутаматергической системы в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. контроль. Для генов *Gad2*, *Grik5*, *Grin1* представлена вспомогательная шкала. Данные выражены в единицах FPKM.

## ДЭГ ГАМКергической системы

Из генов ГАМКергической системы были исследованы гены: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, *Gabrg3*, *Gabrd*, *Gabre*, *Gabrp*, *Gabrq*, *Gabbr1*, *Gabbr2*, *Gabbr3*, *Slc6a11*, *Slc6a13*.

Изменилась экспрессия у 11 из исследованных генов (рис. 4). Среди генов ГАМКергической системы повысилась экспрессия генов *Gabre* ( $p = 0.004$ ,  $q = 0.027$ ), *Gabbr2* ( $p = 0.043$ ), *Slc6a11* ( $p = 0.011$ ,  $q = 0.051$ ). При этом снижена экспрессия генов *Gabra1* ( $p < 0.0001$ ,  $q = 0.002$ ), *Gabra2* ( $p < 0.001$ ,  $q = 0.010$ ), *Gabra3* ( $p = 0.005$ ,  $q = 0.029$ ), *Gabrb2* ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ), *Gabrb3* ( $p = 0.020$ ), *Gabrg1* ( $p < 0.001$ ,  $q = 0.008$ ), *Gabrg2* ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ), *Slc6a13* ( $p < 0.0001$ ,  $q < 0.0001$ ).

В нашем эксперименте у депрессивных животных в ГПТ происходит снижение экспрессии ГАМКергических генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, кодирующих различные субъединицы рецепторов ГАМК, и гена *Slc6a11*, кодирующего белки переносчиков ГАМК. Также о снижении активности ГАМКергической системы свидетельствует сниженная экспрессия гена *Gad2*. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, которые подтверждают низкую экспрессию фермента глутаматдекарбоксилазы у пациентов с депрессивным расстройством [8, 9]. В литературе хорошо освещена вовлеченность ГАМКергической системы в механизмы тревоги и депрессии. Так, например, при исследовании лабораторных животных обнаружено снижение экспрессии разных субъединиц ГАМКа-рецептора у высокотревожных животных и животных с

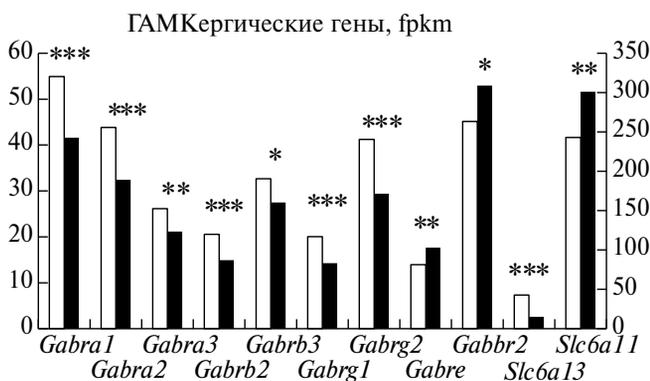
депрессивным расстройством [47, 48]. На активации рецепторов ГАМК основан принцип действия бензодиазепиновых анксиолитиков. Также показано усиление экспрессии ГАМКергических рецепторов под влиянием антидепрессантов [49, 50].

Функциональные взаимосвязи ДЭГ нейротрансмиссерных систем в ГПТ у депрессивных животных по данным сети функциональных белковых ассоциаций STRING (<https://string-db.org/>)

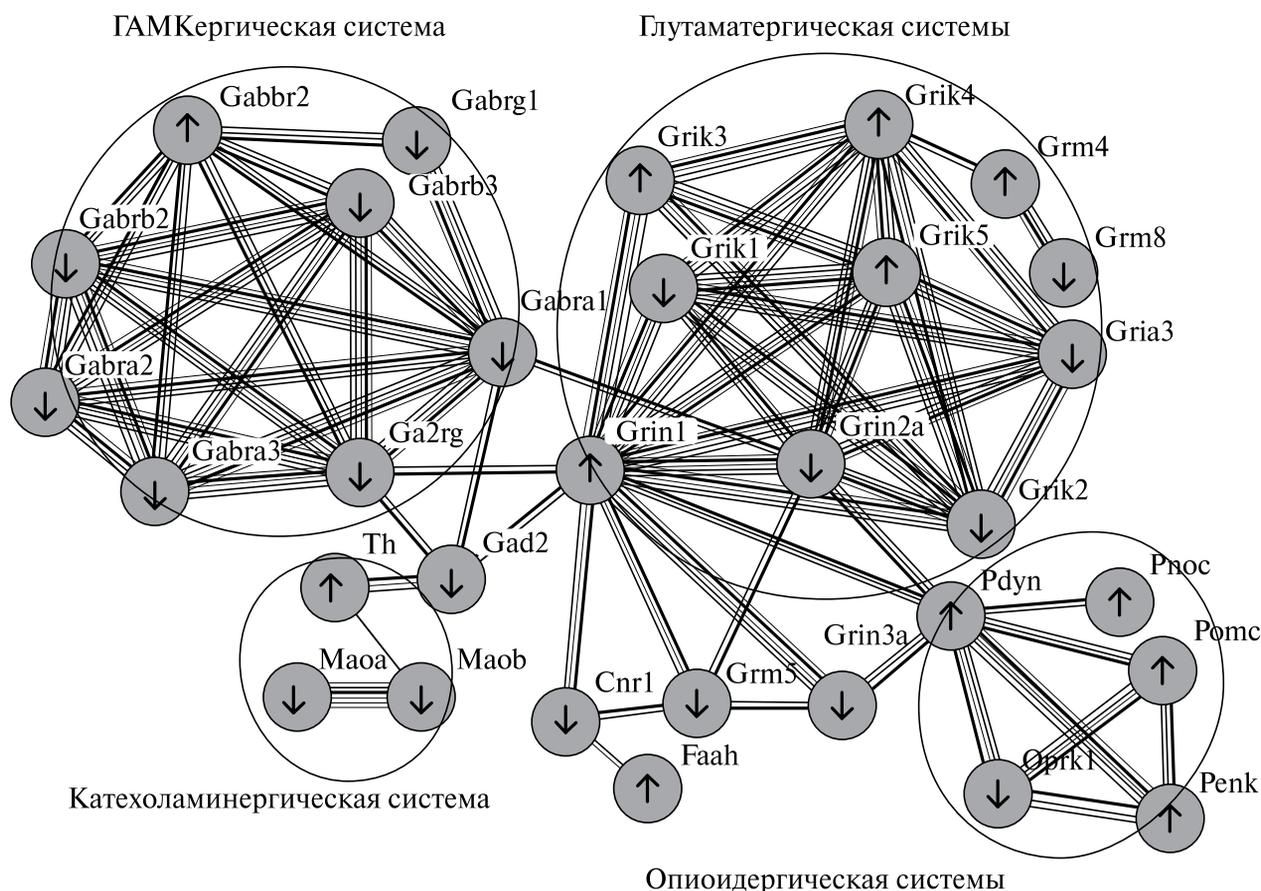
Для исследования взаимосвязей между ДЭГ разных нейротрансмиссерных систем нами была построена сеть функциональных белковых ассоциаций ДЭГ (рис. 5).

При рассмотрении на рис. 5 каждой из нейротрансмиссерных систем (системы обведены овалами: катехоламинергическая, опиоидергическая, глутаматергическая и ГАМКергическая) можно отметить, что наибольшее число взаимосвязей установлено между продуктами генов, относящимися к одной медиаторной системе, и выделить основной связующий ген, на который замыкается наибольшее число генов в одной системе.

Значимая роль в координации катехоламинергических систем была выделена для гена *Th*, который является основным ферментом синтеза тирозингидроксилазы и напрямую взаимосвязан с геном *Maob*, кодирующим ферменты катаболизма катехоламинов. Для опиоидергической системы таким геном может быть продинорфин *Pdyn*, который напрямую взаимосвязан с основными генами внутри системы (*Pnoc*, *Pomc*, *Penk*, *Oprk1*), а также взаимодействует с глутаматергической системой через гены *Grin1* и *Grin3a*, кодирующие глутаматные рецепторы. Согласно литературным данным, существует отрицательная взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *Pdyn* и количеством глутаматергических рецепторов [51, 52]. Для глутаматергической системы таким геном, координирующим работу других рецепторных генов, может быть ген *Grin1*, кодирующий ионотропные NMDA-рецепторы первого подтипа. Для ГАМКергической системы основными генами могут быть гены, кодирующие 1 и 2 подтипы  $\alpha$ -субъединицы ГАМКа-рецептора *Gabra1* и *Gabrg2*, осуществляя функциональную взаимосвязь с другими нейротрансмиссерными системами. Возможно, что взаимодействие гена *Th* и глутаматергической системы осуществляется через *Gad2*, ген фермента метаболизма глутамата. Также через ген *Gad2* осуществляется взаимодействие между глутаматергической (через *Grin1*) и ГАМКергической (через *Gabra1* и *Gabrg2*) системами. Известно, что эти нейротрансмиссерные системы



**Рис. 4.** Экспрессия ДЭГ ГАМКергической системы в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. контроль. Для гена *Slc6a11* представлена вспомогательная шкала. Данные выражены в единицах ФРКМ.



**Рис. 5.** Функциональные взаимосвязи белков, кодируемых ДЭГ, установленные согласно базе данных STRING (<http://string-db.org/>) у депрессивных животных в ГПТ.

играют важную роль в развитии депрессивного состояния [45]. Так как считается, что именно моноамины первыми реагируют на хронический социальный стресс, приводящий к развитию депрессии, то, возможно, именно *Th* можно рассматривать в качестве связующего звена между разными нейротрансмиттерными системами в гипоталамусе. Можно предположить, что в дальнейшем при активации гена, кодирующего тирозингидроксилазу – основной фермент синтеза катехоламинов под влиянием хронического стресса, снижается уровень экспрессии гена *Gad2*, кодирующего глутаматдекарбоксилазу второго типа. Как следствие, экспрессия генов ГАМКергической системы в целом снижается. Но активируется ген *Grin1*, а с ним и остальные гены глутаматергической и опиоидергической систем, многие из которых повышают свою экспрессию. Возможно, гены, которые являются связующими звеньями между разными нейротрансмиттерными системами, через которые осуществляются взаимосвязи с другими системами (*Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1* и *Pdyn*), могут представлять интерес

для фармакологической коррекции депрессивного состояния, так как воздействие на них может нарушить сформированный под воздействием стресса комплекс нейротрансмиттерных нарушений в целом, а не только в пределах одной системы.

При этом все же необходимо отметить, что из общего числа генов, экспрессия которых изменялась под влиянием хронического социального стресса, генам исследуемых нейротрансмиттерных систем в ГПТ принадлежит лишь небольшая часть. Ранее мы обнаружили, что активация митохондриальных, рибосомальных, коллагеновых генов происходит в основном в ГПТ у депрессивных мышей [53]. Мы можем предположить, что развитие митохондриальной дисфункции связано с активацией серотонергической системы. Этот вывод косвенно подтверждается наблюдениями о том [54], что большие с митохондриальными расстройствами могут проявлять первичную психиатрическую симптоматику, включая расстройство настроения, когнитивные нарушения, психоз, тревог.

Также в результате многолетних исследований в нашей лаборатории было показано, что депрессивное расстройство у животных сопровождается развитием психогенного иммунодефицита, проявляющегося в снижении общей резистентности, нарушении гуморального и клеточного иммунитета, процессов пролиферации и апоптоза в иммунокомпетентных органах и усилении процессов онкогенеза [55]. Таким образом, изменения метаболических процессов и рецепторной функции, возникающие в ГПТ в процессе формирования депрессивного состояния, создавая дисбаланс в работе нейромедиаторных систем, могут влиять и на работу генов, однако последовательности молекулярных событий предстоит еще выявить.

Настоящее исследование показало, что в ГПТ, как и в других отделах мозга, хронический социальный стресс приводит к нарушениям в работе нейротрансмиттерных систем не только на уровне синтеза, рецепции и метаболизма сигнальных молекул, но и на уровне функционирования генов. В целом для катехоламинергической, опиоидергической и глутаматергической систем отмечается увеличение экспрессии генов, при этом экспрессия генов ГАМКергической системы снижается. Можно предположить, что ключевую роль в нарушении работы различных нейротрансмиттерных систем играют гены *Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1* и *Pdyn*. При этом в качестве связующего гена между этими системами можно выделить ген *Gad2*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы благодарны ИЦиГ СО РАН (БП №FWNR-2022-0019) за содержание животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-10095).

Исследование одобрено Этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН, Научной комиссией № 9 (март, 24, 2010, № 613).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudryavtseva N.N., Bakshantovskaya I.V., Koryakina L.A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain // Pharmacol. Biochem. Behav. 1991. V.38. P. 315–320, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90284-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90284-9)
2. Августинович Д.Ф., Алексеенко О.В., Бакштановская И.В. и др. Динамические изменения серотонергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование // Успехи физиол. наук. 2004. Т. 35. С. 19–40.
3. Кудрявцева Н.Н., Амстиславская Т.Г., Августинович Д.Ф. и др. Влияние хронического опыта побед и поражений в социальных конфликтах на состояние серотонергической системы головного мозга мышей // Журн. высшей нервной деят. им. И.П. Павлова. 1996. Т. 46. С. 1088–1096.
4. Amstislavskaya T.G., Kudryavtseva N.N. Effect of repeated experience of victory and defeat in daily agonistic confrontations on brain tryptophan hydroxylase activity // FEBS Lettr. 1997. V. 406. P. 106–108. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00252-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00252-4)
5. Smagin D., Boyarskikh U., Bondar N. et al. Reduction of serotonergic gene expression in the raphe nuclei of the midbrain under positive fighting experience in male mice // Adv. Biosci. Biotechnol. 2013. V. 4. P. 36–44.
6. Puglisi-Allegra S., Cabib S. Effects of defeat experiences on dopamine metabolism in different brain areas of the mouse // Aggress. Behav. 1990. V. 16. P. 271–284. <https://doi.org/10.1358/dnp.1998.11.9.863689>
7. Tidey J.W., Miczek K.A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: An in vivo microdialysis study // Brain. Res. 1996. V. 721. P. 140–149. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00159-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00159-x)
8. Fatemi S.H., Stary J.M., Earle J.A. et al. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum // Schizophr. Res. 2005. V. 72. P. 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2004.02.017>
9. Karolewicz B., Maciag D., O'Dwyer G. et al. Reduced level of glutamic acid decarboxylase 67 kDa in the prefrontal cortex in major depression // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2010. V. 13. P. 411–420. <https://doi.org/10.1017/S1461145709990587>
10. Browne C.A., Lucki I. Targeting opioid dysregulation in depression for the development of novel therapeutics // Pharmacol. Ther. 2019. V. 201. P. 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.009>
11. Anderson S.A., Michaelides M., Zarnegar P. et al. Impaired periamygdaloid-cortex prodynorphin is characteristic of opiate addiction and depression // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. P. 5334–5341. <https://doi.org/10.1172/JCI70395>
12. Melo I., Drews E., Zimmer A., Bilkei-Gorzo A. Enkephalin knockout male mice are resistant to chronic mild stress // Genes Brain Behav. 2014. V. 13. P. 550–558. <https://doi.org/10.1111/gbb.12139>
13. Qu N., He Y., Wang C. et al. A POMC-originated circuit regulates stress-induced hypophagia, depression, and anhedonia // Mol. Psychiatry. 2020. V. 25.

- P. 1006–1021.  
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0506-1>
14. *Parsons C.G., Danysz W., Quack G.* Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update // *Drug. News. Perspect.* 1998. V. 11. P. 523–569.  
<https://doi.org/10.1358/dnp.1998.11.9.863689>
  15. *Nestler E.J., Carlezon W.A. Jr.* The mesolimbic dopamine reward circuit in depression // *Biol. Psychiatry.* 2006. V. 59. P. 1151–1159.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018>
  16. *Hashimoto K.* Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder // *Brain. Res. Rev.* 2009. V. 61. P. 105–123.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.05.005>
  17. *Barker D.J., Root D.H., Zhang S., Morales M.* Multiplexed neurochemical signaling by neurons of the ventral tegmental area // *J. Chem. Neuroanat.* 2016. V. 73. P. 33–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.12.016>
  18. *Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B.* Repeated positive fighting experience in male inbred mice // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. P. 2705–2717.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.156>
  19. *Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F.* Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC) // *Aggress. Behav.* 1998. V. 24. P. 271–286.
  20. *Kudryavtseva N.N.* Development of mixed anxiety/depression-like state as a consequence of chronic anxiety: Review of experimental data // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2022. V. 54. P. 125–152.  
[https://doi.org/10.1007/7854\\_2021\\_248](https://doi.org/10.1007/7854_2021_248)
  21. *Коваленко И.Л., Смагин Д.А., Галямина А.Г. и др.* Изменение экспрессии дофаминергических генов в структурах мозга самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: данные RNA-seq // *Мол. биология.* 2016. V. 50. P. 184–187.  
<https://doi.org/10.7868/S00268984116010080>
  22. *Hebert M.A., Serova L.I., Sabban E.L.* Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogenactivated protein kinases in the rat locus coeruleus // *J. Neurochem.* 2005. V. 95. P. 484–498.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03386.x>
  23. *Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M.* Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 535–606.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>
  24. *Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L. et al.* Serotonergic genes in the development of anxiety/depression-like state and pathology of aggressive behavior in male mice: RNA-seq data // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. P. 251–262,  
<https://doi.org/10.7868/S0026898417020136>
  25. *George J.M.* The synucleins // *Genome Biol.* 2002. V. 3.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002>
  26. *Oaks A.W., Sidhu A.* Synuclein modulation of monoamine transporters // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 1001–1006.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.009>
  27. *Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N.* Changes in the expression of neurotransmitter system genes in the ventral tegmental area in depressed mice: RNA-seq data // *Neurosci. and Behav. Physiol.* 2018. V. 48. P. 591–602.
  28. *Frieling H., Gozner A., Römer K.D. et al.* Alpha-synuclein mRNA levels correspond to beck depression inventory scores in females with eating disorders // *Neuropsychobiology.* 2008. V. 58. P. 48–52.  
<https://doi.org/10.1159/000155991>
  29. *Ninkina N., Peters O., Millership S. et al.* Gamma-synucleinopathy: Neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 1779–1794.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp090>
  30. *Merrill J.O., Korff M., Banta-Green C.J. et al.* Prescribed opioid difficulties, depression and opioid dose among chronic opioid therapy patients // *Gen. Hosp. Psychiatry.* 2012. V. 34. P. 581–587.  
<https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2012.06.018>
  31. *Scherrer J. F., Salas J., Copeland L.A. et al.* Prescription opioid duration, dose, and increased risk of depression in 3 large patient populations // *Ann. Fam. Med.* 2016. V. 14. P. 54–62.  
<https://doi.org/10.1370/afm.1885>
  32. *Lazary J., Eszlari N., Juhasz G., Bagdy G.* Genetically reduced FAAH activity may be a risk for the development of anxiety and depression in persons with repetitive childhood trauma // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016. V. 26. P. 1020–1028.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.03.003>
  33. *Wang Y., Zhang X.* FAAH inhibition produces antidepressant-like effects of mice to acute stress via synaptic long-term depression // *Behav. Brain Res.* 2017. V. 324. P. 138–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.054>
  34. *Domschke K., Dannlowski U., Ohrmann P. et al.* Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2008. V. 18. P. 751–759.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.05.003>
  35. *Mitjans M., Serretti A., Fabbri C. et al.* Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment // *Psychopharmacology.* 2013. V. 227. P. 509–519,  
<https://doi.org/10.1007/s00213-013-2995-y>
  36. *Masih J., Verbeke W.* Exploring association of opioid receptor genes polymorphism with positive and negative moods using Positive and Negative Affective

- States Scale (PANAS) // Clin. Exp. Psychol. 2019. V. 5. № 1. P. 1–6.
37. Schol-Gelok S., Janssens A. C., Tiemeier, H. et al. A genome-wide screen for depression in two independent Dutch populations // Biol. Psychiatry. 2010. V. 68. P. 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.01.033>
38. Li X., Tizzano J.P., Griffey K. et al. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098) // Neuropharmacology. 2001. V. 40. P. 1028–1033. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00194-5](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00194-5)
39. Kotlinska J., Liljequist S. The putative AMPA receptor antagonist, LY326325, produces anxiolytic effects without altering locomotor activity in rats // Pharmacol. Biochem. Behav. 1998. V. 60. P. 119–124. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(97\)00565-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(97)00565-0)
40. Walker D.L., Davis M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction // Pharmacol. Biochem. Behav. 2002. V. 71. P. 379–392. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00698-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00698-0)
41. Chourbaji S., Vogt M.A., Fumagalli F. et al. AMPA receptor subunit 1 (GluRA) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression // FASEB J. 2008. V. 22. P. 3129–3134. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106450>
42. Papp M., Moryl E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression // Eur. J. Pharmacol. 1994. V. 263. P. 1–7. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90516-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90516-9)
43. Wiley J.L., Cristello A.F., Balster R.L. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice // Eur. J. Pharmacol. 1995. V. 294. P. 101–107. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00506-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00506-4)
44. Barkus C., McHugh S.B., Sprengel R. et al. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion // Eur. J. Pharmacol. 2010. V. 626. P. 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.014>
45. Stelly C.E., Pomrenze M.B., Cook J.B., Morikawa H. Repeated social defeat stress enhances glutamatergic synaptic plasticity in the VTA and cocaine place conditioning // Elife. 2016. V. 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15448>
46. Wieronska J.M., Branski P., Szewczyk B. et al. Changes in the expression of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the rat hippocampus in an animal model of depression // Pol. J. Pharmacol. 2001. V. 53. P. 659–662.
47. Wang H., Zhu Y.Z., Wong P. T.-H. et al. cDNA microarray analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. // Exp. Brain. Res. 2003. V. 149. P. 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00221-002-1369-1>
48. Kroes R.A., Panksepp J., Burgdorf J. et al. Modeling depression: Social dominance-submission gene expression patterns in rat neocortex // Neuroscience. 2006. V. 137. P. 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.076>
49. Tanay V.A., Glencorse T.A., Greenshaw A.J. et al. Chronic administration of antipanic drugs alters rat brainstem GABAA receptor subunit mRNA levels // Neuropharmacology. 1996. V. 35. P. 1475–1482. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00065-2)
50. Tanay V.M., Greenshaw A.J., Baker G.B., Bateson A.N. Common effects of chronically administered antipanic drugs on brainstem GABA(A) receptor subunit gene expression // Mol. Psychiatry. 2001. V. 6. P. 404–412. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000879>
51. Ménard C., Tse Y.C., Cavanagh C. et al. Knockdown of prodynorphin gene prevents cognitive decline, reduces anxiety, and rescues loss of group 1 metabotropic glutamate receptor function in aging // J. Neurosci. 2013. V. 33. P. 12792–12804. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0290-13.2013>
52. Ménard C., Quirion R., Bouchard S. et al. Glutamatergic signaling and low prodynorphin expression are associated with intact memory and reduced anxiety in rat models of healthy aging // Front. Aging Neurosci. 2014. V. 6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00081>
53. Smagin D.A., Kovalenko I.L., Galyamina A.G. et al. Dysfunction in ribosomal gene expression in the hypothalamus and hippocampus following chronic social defeat stress in male mice as revealed by RNA-seq // Neural. Plast. 2016. 3289187.
54. Raimundo N. Mitochondrial pathology: Stress signals from the energy factory // Trends in Molecular Medicine. 2014. V. 20. N. 5. P. 282–292.
55. Кудрявцева Н.Н., Шурлыгина А.В., Галямина А.Г. и др. Иммунопатология смешанного тревожно-депрессивного расстройства: экспериментальный подход к коррекции иммунодефицитных состояний // Журн. высшей нервной деят. им И.П. Павлова. 2017. Т. 67. № 6. С. 671–692.

## Influence of Chronic Social Stress on the Expression of Genes Associated with Neurotransmitter Systems in the Hypothalamus of Male Mice

I. L. Kovalenko<sup>1, \*</sup>, A. G. Galyamina<sup>1</sup>, D. A. Smagin<sup>1</sup>, N. N. Kudryavtseva<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>FRC Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>2</sup>Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 199034 Russia

\*e-mail: koir0909@mail.ru

Chronic social stress caused by repeated negative experiences in agonistic interactions induces depressive-like behavior in male mice. The aim of the study was to study changes in the expression of genes encoding proteins involved in the metabolism, reception, and transport of catecholamines, opioids, glutamate, and GABA under the influence of chronic stress. Hypothalamic samples were sequenced using RNA-Seq. It was shown that the expression of the catecholaminergic genes *Adra1b*, *Adrbk1*, *Comtd1*, *Ppp1r1b*, *Sncb*, *Sncg*, and *Th* in depressed animals is increased, while the expression of the *Maoa* and *Maob* genes is reduced. The expression of the opioidergic and cannabinoidergic genes *Pdyn*, *Penk*, *Pomc*, *Pnoc*, *Ogfr*, and *Faah* was upregulated, while that of the *Oprk1*, *Opcml*, *Ogfrl1*, and *Cnr1* genes was downregulated. The expression of the glutamatergic genes *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*, *Grin1*, *Grm2*, and *Grm4* was increased, while the expression of the *Gria3*, *Grik1*, *Grik2*, *Grin2a*, *Grin3a*, *Grm5*, *Grm8*, and *Gad2* genes was reduced. The expression of the GABAergic genes *Gabre*, *Gabbr2*, and *Slc6a11* was higher, while the expression of the *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, and *Slc6a13* genes was lower in depressed animals. The data suggest that gene products that interact with other neurotransmitter systems (*Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1*, and *Pdyn*) may be of interest as potential targets for pharmacological correction of the consequences of social stress.

**Keywords:** hypothalamus, chronic social stress, depression, , genes of neurotransmitter systems, RNA-Seq.

УДК 619:636.2:575.174.4

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПЯТИ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО SNP-МАРКЕРАМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С СОСТОЯНИЕМ ЗДОРОВЬЯ

© 2024 г. М. В. Бытов<sup>1</sup>, В. Д. Зубарева<sup>1</sup>, С. В. Вольская<sup>1</sup>, А. Г. Исаева<sup>1</sup>,  
Д. Ю. Нохрин<sup>1</sup>, Ю. А. Осипова<sup>1</sup>, О. В. Соколова<sup>1</sup>. \*

<sup>1</sup>Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр  
Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

\*e-mail: nauka\_sokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 25.12.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2024 г.

Генетическое тестирование животных в настоящее время является важной составляющей в развитии агропромышленного комплекса. Совершенствование молекулярно-генетических технологий с каждым годом позволяет быстрее и дешевле проводить генетические исследования, направленные на поиск наиболее ценных особей крупного рогатого скота. Аборигенные породы крупного рогатого скота являются привлекательным объектом для таких исследований, поскольку обладают большим адаптационным потенциалом и устойчивостью к заболеваниям. Однако современные сравнительные данные о генетическом разнообразии большинства локальных пород по SNP-маркерам, ассоциированным со здоровьем, отсутствуют. Проведение ассоциативных генетических тестов по данным генетическим маркерам для тагильской, сычевской, суксунской и истобенской пород еще предстоит. Цель данной работы – сравнение генетического разнообразия пяти пород крупного рогатого скота по SNP-маркерам, ассоциированным с развитием кетоза, мастита и продуктивным долголетием.

*Ключевые слова:* генетическое разнообразие, крупный рогатый скот, аборигенный скот, однонуклеотидный полиморфизм, ПЦР.

DOI: 10.31857/S0016675824060056 EDN: BXVTWP

Проблема генетического разнообразия отечественного генофонда популяций молочного крупного рогатого скота в условиях активного замещения животными голштинской породы стоит особенно остро [1]. Несмотря на высокие показатели продуктивности, голштинская порода является менее адаптированной к неблагоприятным условиям содержания и кормления, что приводит к значительному сокращению сроков хозяйственного использования коров. В связи с этим представляется актуальным поиск генетических ресурсов среди животных других пород, устойчивых к заболеваниям и неприхотливых к условиям содержания.

В настоящей работе были исследованы аборигенные породы, разводимые на западе, северо-востоке и востоке европейской части России, – истобенская, сычевская, суксунская и тагильская.

Истобенскую породу вывели в конце XIX в. в Кировской области в селе Истобенск при скрещивании местного скота с холмогорской, швицкой и

ярославской породами, при этом частично применяли прилитие крови остфризского и голштинского скота. В племенную книгу она была занесена в 1943 г. [2, 3].

С 1920-х гг. шла работа по усовершенствованию животных, направленная в первую очередь на увеличение у коров молочной продуктивности. В результате селекционной работы в конце XIX века в Сычевском районе Смоленской области получена сычевская порода скрещиванием аборигенных пород с высококровными помесью симментальского скота. Породу утвердили в 1950 г. [4].

Суксунская порода сформирована на основе аборигенного скота с использованием быков красной датской, бурой латвийской, красной степной и красной эстонской пород [5].

Некоторые аборигенные породы крупного рогатого скота уже исчезли, а многие из оставшихся находятся под угрозой исчезновения. Например,

численность тагильской породы на 2022-й г. составляла всего лишь 100 голов [6]. Вероятно, в последние десятилетия голштинская порода использовалась в качестве улучшающей для тагильского крупного рогатого скота, а при формировании породы проводили скрещивание аборигенного скота с ярославской, холмогорской, голландской породами [7].

Оценка и мониторинг генетических вариаций между популяциями и внутри них могут способствовать разработке рациональных и устойчивых программ разведения и сохранения аборигенных пород. Одно из направлений поиска ценных генетических ресурсов – ассоциативные тесты для обнаружения маркеров устойчивости к заболеваниям. Для поиска генетических маркеров, ассоциированных с состоянием здоровья, были отобраны три SNP: rs137396952, rs109452259, rs134055603. Ранее в GWAS-исследованиях данные полиморфизмы показали высокую степень ассоциации с уровнями бета-гидроксимасляной кислоты и развитием субклинического кетоза у крупного рогатого скота молочного направления продуктивности [8], клиническим маститом [9] и продуктивным долголетием [10]. Нами исследовано генетическое разнообразие нескольких пород крупного рогатого скота по данным полиморфизмам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование и методы для генотипирования особей крупного рогатого скота с помощью TaqMan ПЦР методики для SNP подробно описаны нами ранее [11]. Дизайн олигонуклеотидов для новой ПЦР тест-системы для генотипирования полиморфизма rs109452259 был выполнен аналогичным образом [11], последовательность олигонуклеотидов (производство ООО «ДНК-Синт») представлена в табл. 1. Проверка специфичности ПЦР с системой генотипирования TaqMan выполнена с помощью капиллярного электрофореза Qsep100 на картриджах S1 с наибольшей разрешающей способностью.

При анализе генетических данных для трех SNP рассчитывались абсолютные и относительные (в %) частоты встречаемости аллелей и генотипов в каждой из пяти выборок коров пород: голштинская ( $n = 70$ ), истобенская ( $n = 81$ ), суксунская ( $n = 81$ ),

сычевская ( $n = 100$ ) и тагильская ( $n = 86$ ). Сравнение пород по соотношению аллелей и генотипов проводили в ходе анализа таблиц сопряженности критерием хи-квадрат Пирсона, а для выявления ячеек таблицы, давших неслучайный вклад в статистику критерия, рассчитывали согласованные остатки Хабермана [12] с оценкой их статистической значимости с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Расчеты выполнены в пакете PAST (v 4.13 [13]). Распределения генотипов были проверены на соответствие распределению Харди–Вайнберга с использованием точного критерия Холдейна (Haldane's exact test) в пакете HW\_TEST (v 1.1) [14], а для визуализации соотношения генотипов в пяти популяциях были построены диаграммы де Финетти в пакете finetti (version 3.0.5) [15]. Метод главных координат для анализа генетического расщепления пород крупного рогатого скота по всем трем полиморфизмам, а также вычисления степени неравновесного сцепления выполнены с помощью пакета GenAlEx (версия 6.5) для Microsoft Excel [16]. В качестве расстояния на схеме генетического расщепления популяций использовано генетическое расстояние Нэя. Графики для отражения степени неравновесного сцепления построены с помощью веб-инструмента SRplot [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Проверка соответствия распределения генотипов распределению Харди–Вайнберга*

Результаты проверки соотношения генотипов распределению Харди–Вайнберга представлены в табл. 2.

Из представленных данных видно, что в двух случаях по полиморфизму rs109452259 были выявлены статистически значимые отклонения распределения аллелей от равновесных по Харди–Вайнбергу. Такие отклонения могли возникнуть вследствие множества причин: действия отбора, изменчивости числа копий гена, инбридинга и субструктурирования популяции [18, 19]. Наиболее вероятной интерпретацией отклонения от равновесия Харди–Вайнберга является именно действие отбора, который, как видно из сравнения

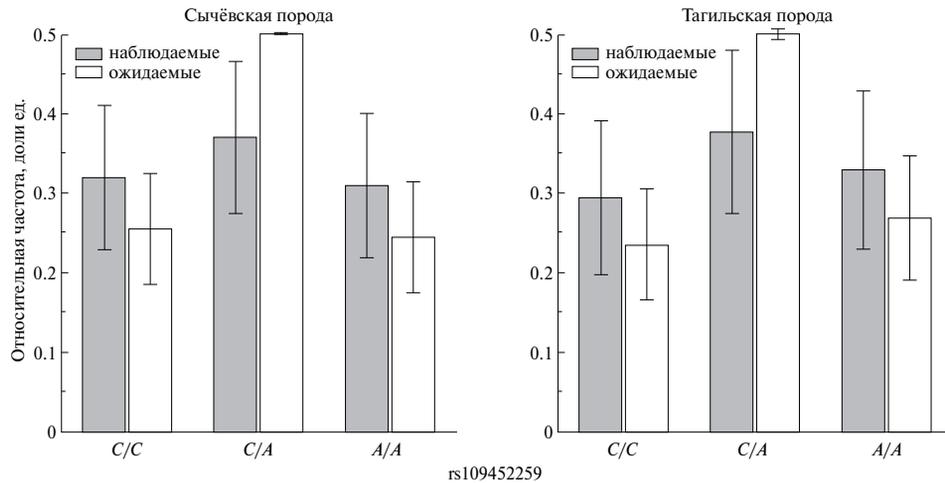
**Таблица 1.** Использованные олигонуклеотиды для генотипирования крупного рогатого скота по rs109452259

	Последовательность	Длина ампликона, пн
rs109452259_F	GCAAAAACACAATATGCTGGAT	415
rs109452259_R	AGGTCAAACAATAACAGTGG	
rs109452259_pA	[ROX]-CTT GTC +A+A+C TT+C +CA-[BHQ2]	
rs109452259_pC	[FAM]-CTTGTC+A+C+CTTCCA-[BHQ1]	

**Таблица 2.** Соответствие распределения генотипов закону Харди–Вайнберга: *p*-значения точного критерия Холдейна

SNP	Голштинская	Истобенская	Суксунская	Сычевская	Тагильская
rs137396952	0.30	0.55	0.82	0.55	0.55
rs109452259	0.44	0.32	0.51	0.0096**	0.0291*
rs134055603	0.44	0.20	0.82	0.43	0.51

Примечание. \*\* –  $p < 0.010$ ; \* –  $p < 0.05$ ; ? – 0.05.



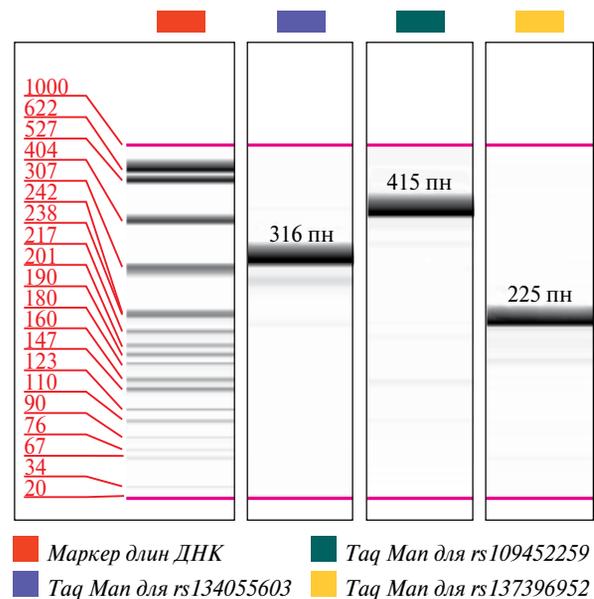
**Рис. 1.** Отклонения наблюдаемых частот генотипов от ожидаемых по Харди–Вайнбергу для двух исследованных пород молочного скота по rs109452259. Разбросом на гистограмме указан 95% ДИ по результатам моделирования Монте-Карло в пакете HW\_TEST.

наблюдаемых и ожидаемых частот, у обеих пород происходит против гетерозигот по rs109452259 (рис. 1).

В качестве проверки возможных ошибок в работе TaqMan системы ПЦР проведен капиллярный электрофорез ампликонов, полученных в результате генотипирования (рис. 2). Ранее описанные нами TaqMan системы [11] по результатам капиллярного электрофореза показали высокую специфичность в отношении соответствия длины нарабатываемого ампликона, результатам анализа по primerBLAST [20], а также отсутствие значимых димеров олигонуклеотидов.

*Сравнение популяций по соотношению аллелей и генотипов*

Результаты сравнения популяций по соотношению генотипов представлены в табл. 3. Из нее видно, что и по соотношению аллелей, и по соотношению генотипов между популяциями изученных пород наблюдались высоко статистически значимые различия по всем трем полиморфизмам. Анализ стандартизованных остатков показал, что эти различия были обусловлены преимущественно

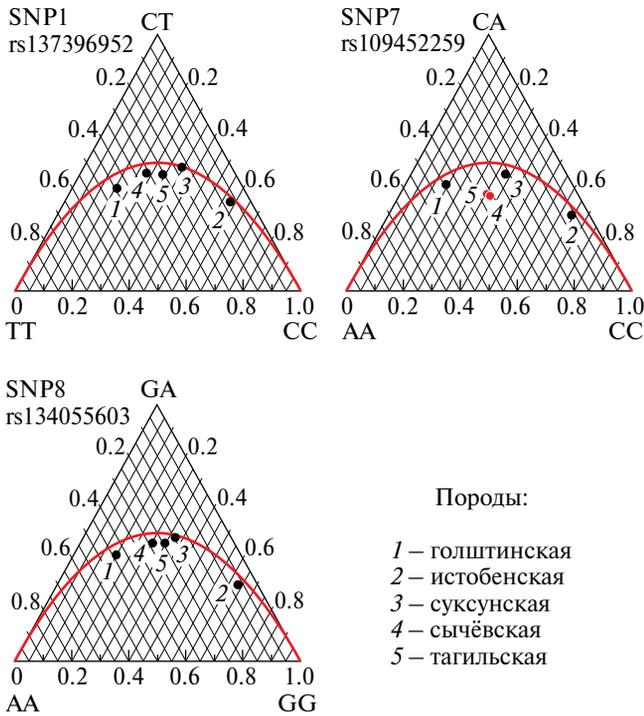


**Рис. 2.** Результаты капиллярного электрофореза продуктов амплификации, получаемых при использовании разработанных TaqMan-систем генотипирования.

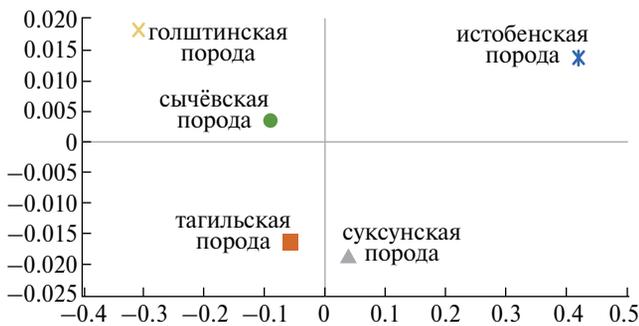
Таблица 3. Сравнения популяций по соотношению аллелей и генотипов трех однонуклеотидных полиморфизмов

rsID / полиморфизм	Аллели		Генотипы	
	rs137396952 / AC_000163.1:g.88817457C>T			
Порода	C	T	Всего	Всего
Голштинская	50 (35,7) AR = -4.52 $p < 0.001$	90 (64,3) AR = 4.52 $p < 0.001$	140 (100)	31 (44,3) AR = 3.990 $p = 0.001$
Истобенская	122 (75,3) AR = 6.31 $p < 0.001$	40 (24,7) AR = -6.31 $p < 0.001$	162 (100)	6 (7,4) AR = -4,14 $p = 0.001$
Суксунская	91 (56,2)	71 (43,8)	162 (100)	16 (19,8)
Сычевская	92 (46,0)	108 (54,0)	200 (100)	31 (31,0)
Тагильская	89 (51,7)	83 (48,3)	172 (100)	22 (25,6)
Различия	$\chi^2_{(4)} = 53.87, p < 0.001$		$\chi^2_{(8)} = 50.77, p < 0.001$	
	rs109452259 / AC_000163.1:g.88800322C>A			
Порода	C	A	Всего	Всего
Голштинская	49 (35,0) AR = -4.97 $p < 0.001$	91 (65,0) AR = 4.97 $p < 0.001$	140 (100)	29 (41,4) AR = 3,61 $p = 0.005$
Истобенская	128 (79,0) AR = 7.10 $p < 0.001$	34 (21,0) AR = -7,10 $p < 0.001$	162 (100)	5 (6,2) AR = -4,68 $p < 0.001$
Суксунская	91 (56,2)	71 (43,8)	162 (100)	17 (21,0)
Сычевская	101 (50,5)	99 (49,5)	200 (100)	31 (31,0)
Тагильская	82 (48,2)	88 (51,8%)	170 (100)	32 (37,6%)
Различия	$\chi^2_{(4)} = 64.73, p < 0.001$		$\chi^2_{(8)} = 56.03, p < 0.001$	
	rs134055603 / AC_000163.1:g.88832335G>A			
Порода	G	A	Всего	Всего
Голштинская	49 (35,0) AR = -4.97 $p < 0.001$	91 (65,0) AR = 4.97 $p < 0.001$	140 (100)	29 (41,4) AR = 4,17 $p < 0.001$
Истобенская	126 (77,8) AR = 6.74 $p < 0.001$	36 (22,2) AR = -6,74 $p < 0.001$	162 (100)	6 (7,4) AR = -4,102 $p = 0.001$
Суксунская	91 (56,2)	71 (43,8)	162 (100)	16 (19,8)
Сычевская	96 (48,0)	104 (52,0)	200 (100)	29 (29,0)
Тагильская	89 (52,4)	81 (47,6)	170 (100)	21 (24,7)
Различия	$\chi^2_{(4)} = 60.62, p < 0.001$		$\chi^2_{(8)} = 58.43, p < 0.001$	

Примечание. AR – остаток Хабермана; значения согласованных остатков AR и соответствующие  $p$ -значения приведены только для ячеек с неслучайным вкладом, в скобках указаны %.



**Рис. 3.** Соотношение частот генотипов трёх полиморфизмов в уральских популяциях молочного скота на диаграммах де Финетти. Красная парабола – равновесное соотношение по Харди-Вайнбергу, красные метки – популяции с отклонением от равновесия.



**Рис. 4.** Схема модели генетического расщепления пяти исследованных пород крупного рогатого скота по принципу главных координат.

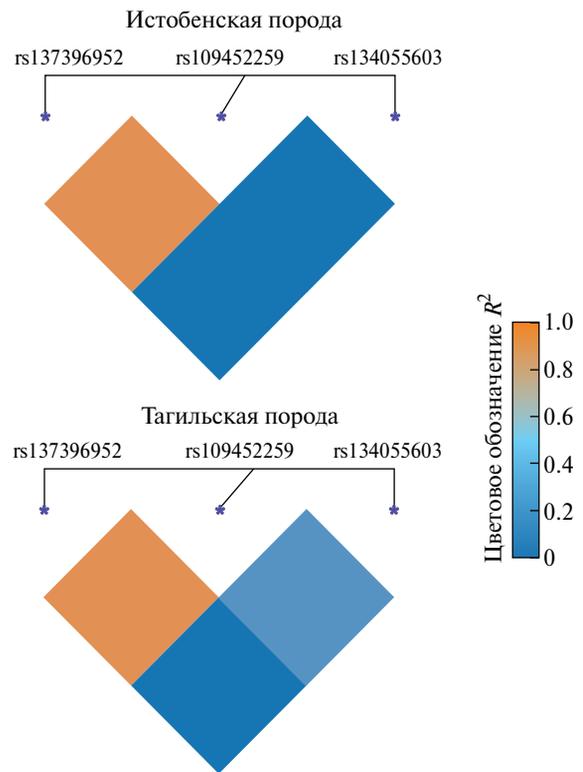
различиями между голштинской и истобенской породами, тогда как остальные три породы были более сходны. Эта же закономерность хорошо видна из диаграмм де Финетти (рис. 3), где голштинская порода (1 на графике) и истобенская (2) занимают крайние положения.

Поскольку для всех трех SNP известны предковые аллели, рис. 3 позволяет также оценить степень насыщения генотипов пяти популяций мутантными вариантами. Гомозигота по предковому аллелю находится в нижнем правом углу

диаграммы де Финетти, а гомозигота по мутантному – в левом. Видно, что для всех трех SNP максимально близкой к предковому генотипу является истобенская порода, а наиболее отдалённой от него – голштинская. В популяционной генетике мутантный аллель часто называют “редки ввиду его меньшей распространенности в популяции. Однако в данном случае мутантные варианты нельзя назвать редкими: в суксунской, сычёвской и тагильской популяциях предковых и мутантных аллелей было примерно поровну (см. табл. 3), а у голштинского скота мутантные варианты встречались примерно в 2 раза чаще предковых.

При distance-based генетическом анализе пяти молочных пород крупного рогатого скота по трем полиморфизмам использован метод главных координат пакета GenAlEx (рис. 4). По упрощенной модели генетического расщепления видно, что наиболее генетически удаленная друг от друга пара пород – голштинская и истобенская, что подтверждает результаты по каждому из SNP исходя из диаграмм Де Финетти.

При анализе неравновесного сцепления (linkage disequilibrium) выявлено, что для истобенской и тагильской пород наблюдаются неравновесные сцепления для пар SNP rs137396952–rs134055603, rs109452259–rs134055603 (рис. 5). Значения



**Рис. 5.** Результаты оценки неравновесного сцепления исследованных полиморфизмов для истобенской и тагильской пород крупного рогатого скота.

коэффициента  $R^2$  для истобенской породы в первой паре SNP равно 0.16, а во второй – 0.13. Для тагильской породы в первой паре SNP коэффициент имеет значение 0.29, во второй – 0.38 соответственно.

Проблема генетического разнообразия отечественного генофонда популяций молочного крупного рогатого скота в настоящее время весьма актуальна [1, 21, 22]. Несмотря на высокие показатели продуктивности голштинской породы, животные других пород, обладающие высоким адаптационным потенциалом и устойчивостью к заболеваниям, могут стать незаменимым источником генетической изменчивости.

Полученные данные позволили обнаружить особенности генетической изменчивости среди исследованных пород. Для сычевской и тагильской пород обнаружено несоответствие равновесию Харди–Вайнберга по однонуклеотидному полиморфизму rs109452259. С учетом специфичности работы ПЦР для генотипирования особей крупного рогатого скота, а также изолированности данных популяций можно сделать предположение о том, что данный SNP находится под воздействием искусственного отбора. Поэтому наши дальнейшие исследования будут направлены на оценку разнообразия полиморфизмов, расположенных в ближайших геномных участках, а именно внутри генов *GC* и *NPFFR2*, а также межгенных регионов.

Несмотря на историю формирования истобенского скота с использованием голштинской породы, полученные нами результаты могут указывать либо о низком вкладе голштинской породы в формирование истобенской породы, либо о достаточной степени изоляции популяции истобенского скота для формирования отдельной генетической группы по данным полиморфизмам. Стоит отметить, что генотипирование по большему количеству полиморфизмов может внести значительные изменения в результаты анализа генетического расщепления.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 22-16-00021 “Изучение ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с ценными физиологическими признаками сельскохозяйственных животных с целью направленной селекции для повышения адаптационного потенциала и долголетия”.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН (Протокол № 6 от 09.11.2023).

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др. Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала // Генетика. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444. <https://doi.org/10.31857/S001667582104010X>.
2. Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Происхождение, селекция и адаптация российских пород крупного рогатого скота по данным полногеномных исследований // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 5. С. 559–568. <https://doi.org/10.18699/VJ19.525>
3. Породы крупного рогатого скота: справочник / Сост. Иванова Н.В., Максимов А.Г. Перси-ановский: Донской ГАУ, 2019. 143 с. URL: <https://e.lanbook.com/book/148559>
4. Фетисова Л.В. Создание и совершенствование сычевской породы крупного рогатого скота. Смоленск: Смоленское кн. изд-во, 1959. 163 с.
5. The State of the World’s Animal Genetic Resources for Food and Agriculture / Eds Rischkowsky B., Pilling D. FAO, 2007. 524 с.
6. Информационная система по разнообразию домашних животных (ИС-РДЖ). [Электронный ресурс] // URL: <https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/ru/> (дата обращения: 10.11.2023).
7. Столповский Ю.А., Бекетов С.В., Солоднева Е.В. и др. Генетическая структура аборигенного тагильского скота по STR- и SNP-маркерам // С.-х. биология. 2021. Т. 56. № 6. С. 1111–1122. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.6.1123rus>.
8. Nayeri S., Schenkel F., Fleming A. et al. Genome-wide association analysis for  $\beta$ -hydroxybutyrate concentration in Milk in Holstein dairy cattle // BMC Genetics. 2019. V. 20. № 58. P. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0761-9>.
9. Horst R.L., Goff J.P., Reinhardt T.A. Calcium and vitamin D metabolism during lactation // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 1997. V. 2. P. 253–263. <https://doi.org/10.1023/A:1026384421273>.
10. Nayeri S., Sargolzaei M., Abo-Ismael M.K. et al. Genome-wide association study for lactation persistency, female fertility, longevity, and lifetime profit index traits in Holstein dairy cattle // J. Dairy Science. 2017. V. 100. № 2. P. 1246–1258. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11770>
11. Бытов М.В., Соколова О.В., Безбородова Н.А. и др. Методы генотипирования крупного рогатого скота для post-GWAS аннотирования SNPs // Аграрный вестник Урала. 2023. № 06 (235). С. 67–75. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2023-235-06-67-75>
12. Haberman S.J. The analysis of residuals in cross-classified tables // Biometrics. 1973. V. 29. № 1. P. 205–220. <https://doi.org/10.2307/2529686>
13. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education

- and data analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
14. Santos F.A.B., Lemes R.B., Otto P.A. HW\_TEST, a program for comprehensive Hardy–Weinberg equilibrium testing // *Genet. Mol. Biol.* 2020. V. 43. № 2. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0380>
  15. Henschke H. De Finetti diagram. [Электронный ресурс] // URL: [https://web.archive.org/web/20110719103301/https://finetti.meb.unibonn.de/downloads/finetti\\_3.0.5\\_windows.zip](https://web.archive.org/web/20110719103301/https://finetti.meb.unibonn.de/downloads/finetti_3.0.5_windows.zip) (дата обращения: 1.11.2023).
  16. Peakall R., Smouse P.E. Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
  17. Tang D., Chen M., Huang X. et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing // *PLoS One*. 2023. V. 18. № 11. P. 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294236>
  18. Chen B., Cole J.W., Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy–Weinberg equilibrium and genotyping error // *Front. Genet.* 2017. V. 8. № 167. P. 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00167>
  19. Abramovs N., Brass A., Tassabehji M. Hardy–Weinberg equilibrium in the large scale genomic sequencing era // *Front. Genet.* 2020. V. 11. № 210. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00210>
  20. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. 2012. V. 13. № 134. P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
  21. Шевелёва О.М., Бахарев А.А., Терещенко И.Я. Экстерьерные особенности крупного рогатого скота мясных пород в условиях Северного Зауралья // *Животноводство и кормопроизводство*. 2023. Т. 106. № 3. С. 35–45.
  22. Зиновьева Н.А., Доцев А.В., Сермягин А.А. и др. Изучение генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного анализа SNP // *С.-х. биология*. 2016. Т. 51. № 6. С. 788–800. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.6.788rus>

## Assessing the Genetic Diversity of Five Cattle Breeds Using SNP Markers Associated with Health

M. V. Bytov<sup>1</sup>, V. D. Zubareva<sup>1</sup>, S. V. Volskaya<sup>1</sup>, A. G. Isaeva<sup>1</sup>,  
D. Yu. Nokhrin<sup>1</sup>, Yu. A. Osipova<sup>1</sup>, O. V. Sokolova<sup>1</sup>. \*

<sup>1</sup>Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre,  
Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620142, Russia

\*e-mail: nauka\_sokolova@mail.ru

Currently genetic evaluation of animals is an important part of the development of the agricultural complex. The improvement of molecular technologies every year makes it possible to carry out genetic research aimed at finding the most valuable animals in a cheaper and faster way. Indigenous breeds of cattle are an attractive object for such research because they have greater adaptive potential and resistance to diseases. However, modern comparative data on the genetic diversity of most local breeds based on SNP markers associated with health are lacking. Genetic association tests using these genetic markers for the Tagil, Sychevskaya, Suksun and Istobenskaya breeds are still to be carried out. The purpose of this work was to compare the genetic diversity of five cattle breeds using SNP markers associated with the development of ketosis, mastitis and productive longevity.

**Keywords:** genetic diversity, cattle, indigenous cattle breeds, single nucleotide polymorphism, PCR.

УДК 575.17:595.77

## ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ КАРЕЛИИ И РАСШИРЕНИЕ СЕВЕРНЫХ ГРАНИЦ ВИДОВЫХ АРЕАЛОВ

© 2024 г. А. В. Москаев<sup>1</sup>, А. Г. Бера<sup>1,2</sup>, В. И. Панов<sup>1</sup>, В. П. Перевозкин<sup>3</sup>, М. И. Гордеев<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Государственный университет просвещения, Московская область, Мытищи, 141014 Россия

<sup>2</sup> Российский государственный университет народного хозяйства имени В. И. Вернадского,  
Московская область, г. Балашиха, 143907 Россия

<sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup> Томский государственный педагогический университет, Томская область, г. Томск, 634061 Россия

\*e-mail: gordeev\_mikhail@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2023 г.

После доработки 23.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Исследовали хромосомную изменчивость в периферийных популяциях малярийных комаров рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae), обитающих на территории Карелии. Установлены современные северные границы ареалов видов-двойников малярийных комаров *An. beklemishevi*, *An. daciae*, *An. messeae* s. s. и *An. maculipennis*. Граница распространения малярийных комаров после 2010 г. сместилась на север на 170 км, от 65-й параллели до Северного полярного круга. В периферийных популяциях *An. beklemishevi* найдены гетерозиготы по инверсиям XL<sub>1</sub>, XL<sub>2</sub>, 2R<sub>2</sub>, 3R<sub>1</sub>, 3R<sub>5</sub>. Периферийные популяции *An. messeae* s. s. были гомозиготными по инверсии половой хромосомы XL<sub>1</sub> и отличались по частотам инверсий аутосомом от популяций средней тайги. В популяции на краю видового ареала увеличилась частота гетерозигот по аутосомным инверсиям 2R<sub>1</sub>, 3R<sub>1</sub> и 3L<sub>1</sub>. Хромосомная изменчивость периферийных популяций способствует расселению малярийных комаров в высоких широтах в условиях потепления климата.

**Ключевые слова:** хромосомный полиморфизм, периферийные популяции, границы ареалов, малярийные комары, *Anopheles*.

DOI: 10.31857/S0016675824060066 EDN: BXSQMP

Микроэволюционные процессы в популяциях, обитающих на краях видового ареала, определяют адаптивную устойчивость вида и возможность его экспансии на новые территории. Периферические популяции рассматриваются как эволюционные форпосты вида, в которых происходит перестройка экологической и генетической структуры, наблюдаются резкие флуктуации популяционных параметров, возникают временные изоляты, сокращается обмен генами и создаются предпосылки для быстрого обновления генофонда [1]. Численность и генетическая структура периферийных популяций сильно зависят от действия лимитирующих факторов, ограничивающих жизнедеятельность на краях видового ареала. Важнейшим лимитирующим фактором для популяций малярийных комаров рода *Anopheles* (Diptera, Culicidae), обитающих на северо-западе европейской части России, в том числе на территории Фенноскандии, является температура воздуха. Мягкий океанический климат способствовал распространению малярийных комаров в высокие широты. В середине XX в.

северная граница распространения малярийных комаров пролегла южнее 65-й параллели [2]. В условиях потепления климата происходит расширение на север ареалов отдельных видов малярийных комаров и изменяется хромосомный состав популяций, обитающих в северной таежной зоне Евразии. Целью данной работы было определение современных границ ареалов и хромосомного полиморфизма в периферийных популяциях близкородственных видов малярийных комаров Карелии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Личинки IV возраста малярийных комаров были отловлены в девяти местах выплода в Карелии в 2009–2010 и 2022 гг. Личинок собирали медицинской кюветой с поверхности воды. Каждую особь в выборках 2022 г. разделяли на две части. Голову и грудь личинки фиксировали в растворе Кларка (3 части 95% этанола и одна часть ледяной уксусной кислоты) и использовали для цитогенетического анализа. Брюшко личинки фиксировали

в 95%-ном этаноле для молекулярно-генетических исследований. Все образцы хранили в отдельных пробирках при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Препараты политенных хромосом изготавливали из слонных желез личинок III и IV возрастов. Парные слонные железы выделяли препаровальными иглами из грудного отдела личинок в фиксирующей жидкости. Железы окрашивали 2%-ным лактоацеторсеином в течение 60 мин и промывали в 45%-ном раствором уксусной кислоты. После промывки железы давили под покровным стеклом. Полученные препараты анализировали под световым микроскопом Nikon Eclipse E200. Виды-двойники *An. beklemishevi* Stegny et Kabanova, 1976; *An. maculipennis* Meigen, 1818; *An. messeae* Falleroni, 1926 диагностировали по рисунку дисков политенных хромосом, сравнивая с фотокартами кариотипов этих видов [3–5]. Гомозиготы и гетерозиготы по хромосомным инверсиям определяли у полиморфных видов *An. beklemishevi* и *An. messeae* s. l. Кариотипы изучены у 1595 комаров. Межпопуляционную вариативность частот инверсионных генотипов оценивали с помощью критерия Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) [6]. Стандартный индекс  $F_{ST}$  рассчитывали с использованием программного пакета Fstat 2.9.4. [7].

Для молекулярной идентификации использовали предварительно отделённые части личинок (брюшко). Всех особей анализировали индивидуально. Тотальную ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием Implen NanoPhotometer NP80. Концентрацию доводили до 30–60 нг/мкл. ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл с использованием наборов для амплификации EncycloPlus PCR kit (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Фрагменты ITS2 получали с помощью праймеров, подобранных с помощью программы Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). Характеристика использованных праймеров дана в табл. 1.

Полученные ПЦР-продукты окрашивали бромистым этидием и анализировали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле и буфере TBE. ПЦР–ПДРФ идентификацию видов *An. messeae*/*An. daciae* проводили с помощью эндонуклеазы RsaI (SibEnzyme, Россия). У *An. daciae* и *An. messeae* разное количество сайтов рестрикции для эндонуклеазы RsaI (3 и 4 соответственно). Длина рестрикционных фрагментов составила 10, 47, 50 и 364 пн для *An. daciae* и 10, 47, 50, 72 и 292 пн для *An. messeae*. Для подтверждения ПДРФ-идентификации случайно отобранные образцы из двух северных местообитаний комаров пгт. Чупа и г. Кемь были секвенированы по Сэнгеру. Для секвенирования ПЦР-фрагменты очищали из геля с использованием набора для элюции Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагментов

с прямого и обратного праймеров определяли на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Биоинформатический анализ хроматограмм проводили с помощью программы ChromasPro 13.3 (Technelysium, Австралия). Выравнивание последовательностей, полученных в результате секвенирования, с последовательностями, размещенными в базах данных GenBank, было выполнено с использованием ресурсов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Видовой состав и границы ареалов*

Фауна малярийных комаров Карелии представлена близкородственными видами-двойниками комплекса *Maculipennis*: *An. beklemishevi*, *An. maculipennis* s. s., *An. messeae* s. l. (последний включает виды-двойники *An. daciae* Linton, Nicolescu & Harbach, 2004 и *An. messeae* s. s.) (табл. 2). Виды малярийных комаров неравномерно распределены на территории Карелии (рис. 1). Все виды совместно обитают на юге, в подзоне средней тайги. Условная граница средней тайги в Карелии проходит вблизи 63-й параллели [8]. *An. maculipennis* и *An. messeae* s. l. повсеместно доминируют в личиночных биотопах южнее 63-й параллели, тогда как комары *An. beklemishevi* встречаются с низкой частотой 1.1–7.2% и не во всех водоемах. Иное территориальное распределение видов наблюдается севернее 63-й параллели, в подзоне северной тайги. Все перечисленные виды встречаются в биотопах до 65-й параллели. Доля *An. beklemishevi* в совместных местах выплода достигает 16.0–64.6%. По-видимому, именно 65 параллель служила северной границей распространения малярийных комаров в Карелии в 2010 г. [9]. Личинки малярийных комаров не были обнаружены в этом году в ряде обследованных водоемов в окрестностях пгт Лоухи (66.077640, 33.075553). Одной из задач полевых исследований в 2022 г. было определение современных северных границ ареалов видов-двойников. Локальная популяция *An. beklemishevi* найдена в оз. Нигрозере (66.551536° с. ш.) у Северного полярного круга (66.5622° с. ш.). Фактически за 12 лет граница расселения малярийных комаров сместилась на север на 170 км. Самая северная популяция *An. messeae* обнаружена на 30 км южнее, в водоеме в пгт. Чупа Лоухского района (66.261565° с. ш.). Отмеченные биотопы являются самыми северными местами выплода малярийных комаров в европейской части России. Следует отметить, что ареалы двух видов в северной тайге

**Таблица 1.** Праймеры для идентификации видов-двойников *An. messeae*/*An. daciae* по фрагменту последовательности ITS1 кластера рибосомной ДНК

№	Имя праймера	Последовательность праймера 5'–3'	Длина ПЦР-фрагмента (пн)	Полиморфные сайты по референсной последовательности GenBank ID AY648982, используемые для диагностики <i>An. messeae</i> / <i>An. daciae</i>	
				412	432
1	ITS638F	TGAACTGCAGGACACATGAAC	471	G/A	G/C
2	ITS638R	CCTACGTGCTGAGCTTCTCC			

являются фрагментированными. Многие потенциально пригодные для выплода личинок биотопы не заселены малярийными комарами. Например, личинок и куколок не нашли в более южных биотопах – в оз. Раудуламби, Амбарнское сельское поселение Республики Карелия (65.925928, 33.117315).

В июле 2022 г. нами были обследованы водоемы в Мурманской области, расположенные к северу от полярного круга: в окрестностях г. Кандалакша – озеро у губы Лупче (67.159583, 32.375519), пруд в районе губы Лупче (67.162094, 32.374103), р. Нива (67.147768, 32.424096), пруд у р. Нива (67.147184, 32.428109), болото у р. Нива (67.146078, 32.426983); озеро в окрестностях пгт Зеленоборский (66.866782, 32.390384); озеро в окрестностях с. Княжья губа (66.869059, 32.399852); пруды в г. Мончегорске (67.941813, 32.896272; 67.947667, 32.874325); заболоченность в окрестностях г. Кировска (67.648564, 33.702231). Во всех этих биотопах личинки и куколки малярийных комаров не обнаружены, а также не было прилетов имаго комаров комплекса *Maculipennis*. Согласно нашим данным, в северной таежной подзоне Заполярья (Кандалакша, Зеленоборский, Княжья губа, Кировск) и в арктической лесотундре (Мончегорск) комары рода *Anopheles* не обитают.

Самое северное местообитание комаров *An. maculipennis* выявлено нами в г. Кемь (64.953534° с. ш.). В 70-е годы XX в. северная граница ареала этого вида проходила в Ленинградской области, значительно южнее г. Петрозаводска [10]. В настоящее время вид продвинулся до северной таежной подзоны в Карелии. Комары *An. maculipennis*

доминируют в постоянных и временных личиночных биотопах г. Петрозаводска и г. Кемь. В выборке 2022 г. в Петрозаводске (временный водоем в пойме р. Рыбка) доля *An. maculipennis* составила 99,3%. Личинки этого вида найдены в биотопах городов Кондапога, Медвежьегорск, Сегеж и Беломорск (табл. 2). Вероятной причиной расширения ареала *An. maculipennis* на север является потепление климата. Потепление климата в таежной зоне Евразии приводит к смягчению условий зимовки и увеличению продолжительности летнего сезона размножения у малярийных комаров [11]. Комары *An. maculipennis* расселяются не только на севере, но и продвинулись на восток, от Поволжья до Южного Урала [12].

#### Хромосомный полиморфизм

Хромосомная изменчивость видов-двойников малярийных комаров приурочена к конкретным ландшафтно-климатическим зонам [13]. Это в полной мере относится к популяциям *An. beklemishevi* и *An. messeae* s. l., обитающим на территории Карелии. В популяциях *An. beklemishevi* северной таежной подзоны найдены гетерозиготы по следующим хромосомным инверсиям (в скобках указана локализация инверсий): XL<sub>1</sub> (1d-3b), XL<sub>2</sub> (2c-5c), 2R<sub>2</sub> (7c-9a), 3R<sub>1</sub> (23b-26a), 3R<sub>5</sub> (27b-29c) [4]. Частоты гетерозигот по половым хромосомам рассчитывали у самок (здесь и в дальнейшем *n* – число изученных особей). Доля гетерозигот XL<sub>01</sub> в Сегеже составила 2.0 ± 2.0% (*n* = 50); в Беломорске – 15.4 ± 7.1% (*n* = 26). Доля гетерозигот XL<sub>02</sub> в Сегеже составила 20.0 ± 5.7% (*n* = 50); в Беломорске – 7.7 ± 5.2% (*n* = 26);

Таблица 2. Видовой состав малярийных комаров в местообитаниях Карелии

№	Местообитание, координаты	Дата сбора	Число особей	Индекс доминирования ( $f \pm s_f, \%$ )		
				<i>An. messeae</i> s. l.	<i>An.</i> <i>maculipennis</i>	<i>An. beklemishevi</i>
1	г. Петрозаводск, дренажная канава в пойме р. Рыбка (61.795465, 34.280368)	02.08. 2022	143	0.7 ± 0,7	99.3 ± 0.7	0
2	г. Петрозаводск, заболоченность в пойме р. Ласосинка (61.777579, 34.354456)	23.07. 2009	110	28.2 ± 4.3	71.8 ± 4.3	0
3	г. Петрозаводск, заболоченность (61.779865, 34.363274)	10.08. 2010	271	40.6 ± 3.0	58.3 ± 3.0	1.1 ± 0.6
4	Прионежский р-н, с. Шуя, заболоченность в пойме р. Шуя (61.890139, 34.248805)	23.07. 2009	46	100	0	0
5	г. Кондопога, пруд (62.202047, 34.234599)	12.08. 2010	143	69.9 ± 3.8	27.3 ± 3.7	2.8 ± 1.4
6	г. Медвежьегорск, пруд (62.918425, 34.451519)	13.08. 2010	169	47.9 ± 3.8	45.0 ± 3.8	7.1 ± 2.0
7	г. Сегежа, канава вокруг болота (63.754374, 34.305334)	16.08. 2010	144	34.0 ± 3.9	1.4 ± 1.0	64.6 ± 4.0
8	г. Беломорск, пруд (64.512771, 34.778731)	15.08. 2010	190	75.8 ± 3.1	0	24.2 ± 3.1
9	г. Беломорск, пруд (64.544193, 34.787569)	31.07. 2022	51	96.1 ± 2.7	3.9 ± 2.7	0
10	г. Кемь, река Большая Пуэта (64.951902, 34.565763)	14.08. 2010	137	1.5 ± 1.0	82.5 ± 3.2	16.0 ± 3.1
11	г. Кемь, река Большая Пуэта (64.953534, 34.573063)	27.07. 2022	103	45.6 ± 4.9	54.4 ± 4.9	0
12	Лоухский р-н, посёлок городского типа Чупа, пруд (66.261565, 33.021291)	28.07. 2022	42	100	0	0
13	Лоухский р-н, Малиновараккское сел. поселение, оз. Нигрозеро (66.551536, 32.757391)	20.07. 2022	46	0	0	100

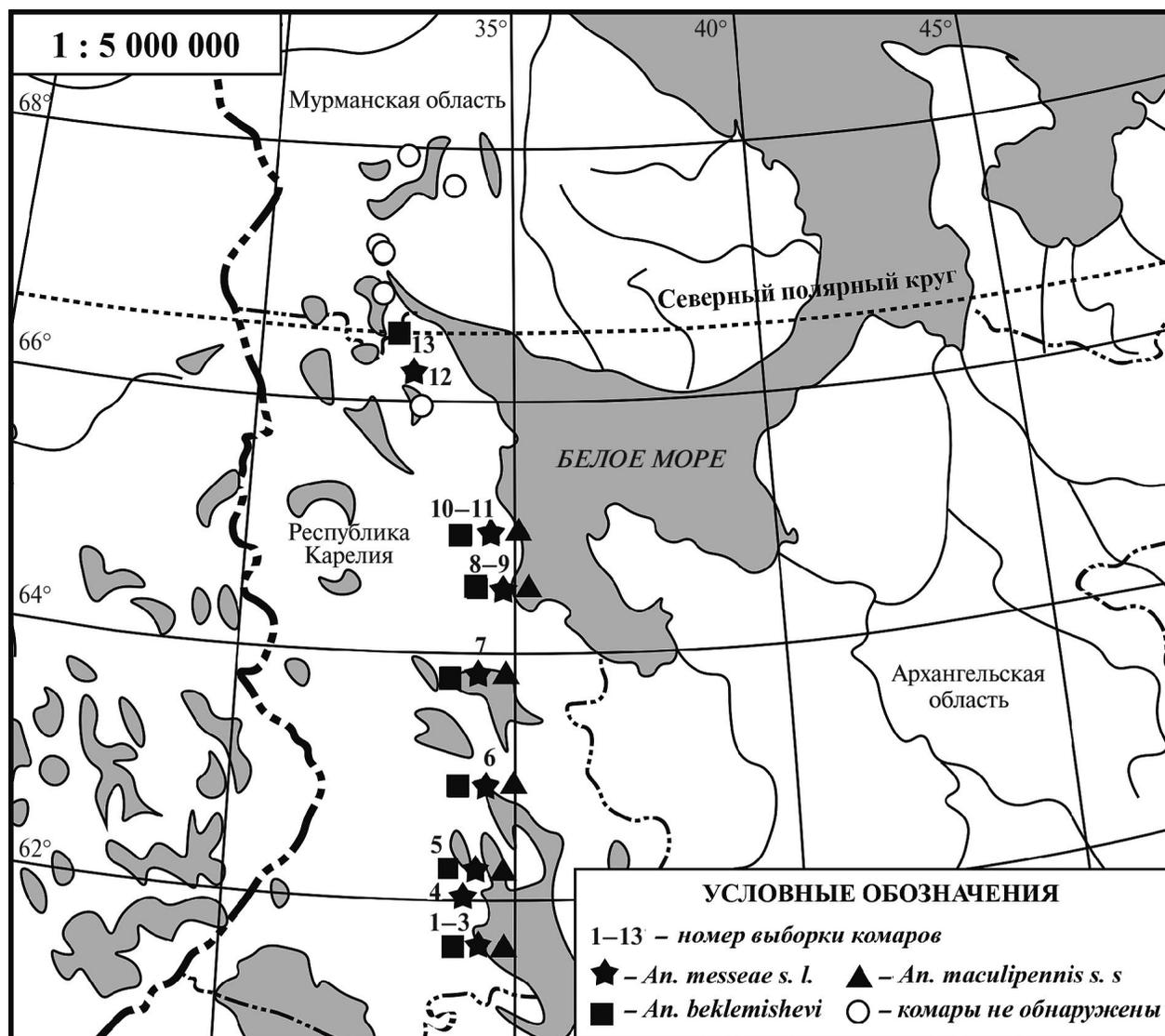


Рис. 1. Географическое распространение видов-двойников малярийных комаров рода *Anopheles* в биотопах Карелии. Координаты и цифровые обозначения биотопов приведены в табл. 2.

в Нигрозере –  $3.8 \pm 3.7\%$  ( $n = 26$ ). Гетерозиготы по аутомным инверсиям  $3R_1$ ,  $2R_2$  и  $3R_5$  были обнаружены в двух самых северных популяциях *An. beklemishevi*. Частота гетерозигот  $3R_{01}$  составила в Нигрозере –  $2.2 \pm 2.2\%$  ( $n = 46$ ); в Беломорске –  $6.5 \pm 3.6\%$  ( $n = 46$ ). В Беломорске в 2010 г. также были найдены гетерозиготы  $2R_{02}$  и  $3R_{05}$  каждая с частотой  $2.2 \pm 2.2\%$  ( $n = 46$ ). Следует отметить, что хромосомная изменчивость у *An. beklemishevi* сохраняется на низком уровне в популяции Нигрозера на самом краю видового ареала.

Высокий уровень хромосомного полиморфизма найден в популяциях *An. messeae s. l.* (табл. 3–4). В кариотипах комаров *An. messeae s. l.* найдены гомо- и гетерозиготы по следующим хромосомным инверсиям:  $XL_0$  (2a–5b),  $XL_1$  (принята за стандарт),

$XL_2$  (1b–4b),  $2R_1$  (7b/c–12c/13a),  $3R_1$  (23c/24a–26c/27a),  $3L_1$  (34b/34c–37a/37b–38c/39a–39c/d) [5]. Инверсия  $3L_1$  состоит из двух перекрывающихся инверсий. Частоты инверсий варьируют в локальных популяциях Карелии, однако в целом кариотипическое разнообразие является типичным для популяций *An. messeae s. l.*, обитающих в таежной зоне Евразии [13–14]. Выборки 2010 г. использовали для сравнения хромосомного состава особей из популяций южной, центральной и северной частей Карелии [9]. В настоящей работе мы изучили дополнительный коллекционный материал 2009–2010 гг. и сравнили объединенные данные по кариотипам комаров средней таежной подзоны (Петрозаводск–Шуя–Кондапога–Медвежьегорск) и северной таежной подзоны (Беломорск–Кемь).

Таблица 3. Частоты хромосомных вариантов в популяциях *An. messeae* в подзоне средней тайги в Карелии

Инверсионные гомо-и гетерозиготы	Частоты хромосомных вариантов, $f \pm s_p, \%$					
	Петрозаводск 23.07.2009	Петрозаводск 10.08.2010	Шуя 27.07.2009	Кондопога 18.08.2010	Медвежьегорск 13.08.2010	
Самцы, <i>n</i>	63	14	17	39	34	
XL <sub>0</sub>	34.9 ± 6.0	50.0 ± 13.4	41.2 ± 11,9	56.4 ± 7,9	76.5 ± 7.3	
XL <sub>1</sub>	65.1 ± 6.0	50.0 ± 13.4	58.8 ± 11,9	43.6 ± 7,9	23.5 ± 7.3	
Самки, <i>n</i>	47	17	29	61	47	
XL <sub>00</sub>	36.2 ± 7.0	58.8 ± 11.9	24.1 ± 7,9	37.7 ± 6.2	51.1 ± 7.3	
XL <sub>01</sub>	14.9 ± 5.2	11.8 ± 7.8	13.8 ± 6,4	14.8 ± 4.5	12.8 ± 4.9	
XL <sub>11</sub>	48.9 ± 7.3	29.4 ± 11.1	62.1 ± 9,0	47.5 ± 6.4	34.0 ± 6.9	
XL <sub>12</sub>	0	0	0	0	2.1 ± 2.1	
Оба пола, <i>n</i>	110	31	46	100	81	
2R <sub>00</sub>	60.0 ± 4.7	71.0 ± 8.2	82.6 ± 5,6	76.0 ± 4.3	77.8 ± 4.6	
2R <sub>01</sub>	39.1 ± 4.7	25.8 ± 7.9	10.9 ± 4,6	22.0 ± 4.1	19.7 ± 4.4	
2R <sub>11</sub>	0.9 ± 0.9	3.2 ± 3.2	6.5 ± 3,6	2.0 ± 1.4	2.5 ± 1.7	
3R <sub>00</sub>	52.7 ± 4.8	71.0 ± 8.2	39.1 ± 7,2	59.0 ± 4.9	67.9 ± 5.2	
3R <sub>01</sub>	35.5 ± 4.6	19.3 ± 7.1	50.0 ± 7,4	33.0 ± 4.7	29.6 ± 5.1	
3R <sub>11</sub>	11.8 ± 3.1	9.7 ± 5.3	10.9 ± 4,6	7.0 ± 2.6	2.5 ± 1.7	
3R <sub>02</sub>	0	0	0	1.0 ± 1.0	0	
3L <sub>00</sub>	90.0 ± 2.9	96.8 ± 3.2	93.5 ± 3,6	90.0 ± 3.0	96.3 ± 2.1	
3L <sub>01</sub>	10.0 ± 2.9	3.2 ± 3.2	4.3 ± 3,0	10.0 ± 3.0	3.7 ± 2.1	
3L <sub>11</sub>	0	0	2.2 ± 2,2	0	0	

**Таблица 4.** Частоты хромосомных вариантов в популяциях *An. messeae* в подзоне северной тайги в Карелии

Инверсионные гомо- и гетерозиготы	Частоты хромосомных вариантов, $f \pm s_f$ , %				
	Сегежа 16.08.2010	Беломорск 15.08.2010	Беломорск 31.07.2022	Кемь 27.07.2022	Чупа 28.07.2022
Самцы, $n$	28	68	25	30	19
$XL_0$	$67.9 \pm 8.8$	$47.1 \pm 6,1$	0	0	0
$XL_1$	$32.1 \pm 8.8$	$52.9 \pm 6,1$	100	100	100
Самки, $n$	21	76	26	17	23
$XL_{00}$	$23.8 \pm 9.3$	$28.9 \pm 5,2$	0	0	0
$XL_{01}$	$52.4 \pm 11.0$	$23.7 \pm 4,9$	0	0	0
$XL_{11}$	$23.8 \pm 9.3$	$47.4 \pm 5,7$	100	100	100
Оба пола, $n$	49	144	49	47	42
$XL_0$	$57.1 \pm 5.9$	$42.7 \pm 3,3$	0	0	0
$XL_1$	$42.9 \pm 5.9$	$57.3 \pm 3,3$	100	100	100
$2R_{00}$	$71.4 \pm 6.5$	$68.1 \pm 3,9$	$57.2 \pm 7.1$	$46.8 \pm 7,3$	$16.7 \pm 5.8$
$2R_{01}$	$22.5 \pm 6.0$	$23.6 \pm 3,5$	$36.7 \pm 6.9$	$44.7 \pm 7,3$	$66.6 \pm 7.3$
$2R_{11}$	$4.1 \pm 2.8$	$8.3 \pm 2,3$	$6.1 \pm 3.4$	$8.5 \pm 4,1$	$16.7 \pm 5.8$
$2R_{03}$	$2.0 \pm 2.0$	0	0	0	0
$3R_{00}$	$44.9 \pm 7.1$	$59.7 \pm 4,1$	$46.9 \pm 7.1$	$48.9 \pm 7,3$	$47.6 \pm 7.7$
$3R_{01}$	$44.9 \pm 7.1$	$34.7 \pm 4,0$	$42.9 \pm 7.1$	$38.3 \pm 7,1$	$52.4 \pm 7.7$
$3R_{11}$	$10.2 \pm 4,3$	$5.6 \pm 1,9$	$10.2 \pm 4.3$	$12.8 \pm 4,9$	0
$3L_{00}$	100	$97.9 \pm 1,2$	$91.8 \pm 3.9$	$87.2 \pm 4,9$	$57.1 \pm 7.6$
$3L_{01}$	0	$2.1 \pm 1,2$	$8.2 \pm 3.9$	$8.5 \pm 4,1$	$42.9 \pm 7.6$
$3L_{11}$	0	0	0	$4.3 \pm 2,9$	0

Установлено, что комары средней и северной тайги отличаются по частотам генотипов половой хромосомы у самок: в северной тайге была выше доля гетерозигот  $XL_{01}$  ( $\chi^2 = 9.77$ ; число степеней свободы  $df = 1$ ;  $p < 0.01$ ). Значительные различия выявлены по составу аутосом. В северной тайге выше доля гомо- и гетерозигот по инверсии  $2R_1$  ( $\chi^2 = 7.57$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0.05$ ), но ниже частота гетерозигот с инверсией  $3L_1$  ( $\chi^2 = 7.76$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.01$ ). По нашему мнению, данные различия обусловлены разным соотношением видов-двойников *An. daciae* и *An. messeae* s. s. в таежных биотопах. Комары этих видов, входящих в группу *An. messeae* s. l., отличаются несколькими диагностическими инверсиями. Кариотипы с инверсией  $XL_0$  практически отсутствуют у *An. messeae* s. s., в то время как гомо- и

гетерозиготы с инверсией  $2R_1$  крайне редко встречаются у *An. daciae*. Хромосомные перестройки  $3R_1$  и  $3L_1$  с разной частотой встречаются у обоих видов [14]. Выявлены случаи межвидовой гибридизации в зонах симпатрии, но доля таких гибридов в таежных местообитаниях незначительна. Возможно, это обусловлено пониженной приспособленностью гибридов, в особенности в местообитаниях северной таежной зоны.

Значительный интерес представляют данные цитогенетического анализа периферийных популяций в выборках 2022 г. Уровень межпопуляционных различий по хромосомному составу показывает величина стандартного индекса  $F_{ST}$  (табл. 5). Изменчивость состава половых хромосом оценивали отдельно у самок, поскольку самцы являются

**Таблица 5.** Значения  $F_{ST}$  при попарных сравнениях выборок из популяций Карелии по инверсионным вариантам половых хромосом у самок и по аутосомам у особей обоих полов

Выборки	Попарные сравнения выборок по половым хромосомам самок										
	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Петрозаводск 2010	Чуша 2022
Петрозаводск 2009	0.0524	0.1728	0.0431	- 0.0245	0.0084	0.0822	0.6745*	0.6278*	0.6686*		
Петрозаводск 2010		0.0094	- 0.0159	0.0192	- 0.0177	- 0.0122	0.3521*	0.3236*	0.3483*		
Шуя 2009			0.0189	0.1063	0.0461	0.0015	0.2679	0.2333	0.2633		
Кондапога 2010				0.0139	- 0.0199	- 0.0082	0.3488*	0.3249*	0.3456*		
Медвежьегорск 2010					- 0.0150	0.0403	0.4811*	0.4516*	0.4772*		
Сегежа 2010						- 0.0040	0.5065*	0.4610*	0.5005*		
Беломорск 2010							0.2985*	0.2792*	0.2959*		
Беломорск 2022								-	-		
Кемь 2022											
	Попарные сравнения выборок по аутосомам у особей обоих полов										
Петрозаводск 2009	0.0036	0.0318	- 0.0058	- 0.0078	0.0215	- 0.0086	0.0108	0.0281	0.1259*		
Петрозаводск 2010		0.0095	0.0063	0.0256	0.0188	0.0036	- 0.0049	0.0063	0.1026*		
Шуя 2009			0.0188	0.0572	0.0016	0.0335	0.0122	0.0324	0.1519*		
Кондапога 2010				0.0031	0.0090	0.0051	0.0172	0.0395	0.1567		
Медвежьегорск 2010					0.0313	0.0091	0.0430	0.0695*	0.1897*		
Сегежа 2010						0.0270	0.0315	0.0637*	0.2024*		
Беломорск 2010							0.0064	0.0241	0.1330*		
Беломорск 2022								- 0.0047	0.0778		
Кемь 2022									0.0382		

Примечание. \* – значимые различия ( $p < 0.05$ ).

гемизиготами и имеют только одну политенизирующуюся половую хромосому XL. Каждая выборка 2022 г. из местообитаний северной тайги (Беломорск, Кемь, Чупа) значительно отличается по величине  $F_{ST}$  от любых выборок из биотопов средней тайги, за исключением популяции в пос. Шуя на юге Карелии (табл. 5). Комары из биотопов северной тайги полностью гомозиготны по инверсии  $XL_1$ , в то время как во всех личиночных биотопах средней тайги встречаются комары *An. daciae* с инверсией  $XL_0$ . Важно отметить, что самки из биотопов г. Беломорска в 2010 и 2022 гг. имели разный состав по половым хромосомам ( $\chi^2 = 15.76$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.001$ ). В 2022 г. не найдено ни одной гомозиготы  $XL_{00}$  или гетерозиготы  $XL_{01}$ . Вероятно, северная граница распространения комаров *An. daciae* с инверсией  $XL_0$  подвижна и нестабильна. Как известно, летние месяцы 2010 г. были аномально жаркими на Русской равнине и севере европейской части России. Погодная аномалия могла способствовать временному смещению на север границы ареала *An. daciae*. В частности, одна самка с генотипом  $XL_{01}$  была найдена в личиночном биотопе г. Кемь в 2010 г. В выборке 2022 г. в г. Кемь гомо- и гетерозиготы с инверсией  $XL_0$  отсутствовали. Для уточнения видового статуса комаров в выборках 2022 г. был проведен молекулярно-генетический анализ. Идентификации видов-двойников *An. daciae* и *An. messeae* s. s. осуществляли методом ПЦР–ПДРФ. Были изучены 10 образцов из пгт Чупа (выборка № 12) и 22 образца из г. Кемь (выборка № 11). Все образцы были определены как *An. messeae* s. s. Для подтверждения ПДРФ-идентификации полученные ПЦР-продукты были секвенированы. Все образцы имели общий гаплотип по проанализированному нами фрагменту транскрибируемого спейсера ITS2, характерный для *An. messeae* s. s. (GenBank ID: PP115571, PP115572). Результаты цитогенетического и молекулярно-генетического анализа свидетельствуют об отсутствии *An. daciae* в биотопах северной таежной подзоны. Очевидно, современная северная граница ареала *An. daciae* проходит южнее 64-й параллели, на границе средней и северной тайги.

Выборки комаров 2022 г. из северных таежных местообитаний отличались по составу аутосом от выборок личинок из биотопов средней тайги. Значимые величины  $F_{ST}$  получены при попарных сравнениях выборок из северных популяций комаров г. Кемь и пгт Чупа с выборками комаров из большинства других мест выплода (табл. 5). Особенно выделяется периферийная популяция пгт Чупа. Комары этой популяции отличаются от объединенной выборки из северных биотопов г. Кемь и г. Беломорска повышенной частотой инверсионных гетерозигот  $2R_{01}$  ( $\chi^2 = 15.48$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0.001$ );  $3R_{01}$  ( $\chi^2 = 6.60$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0.05$ ) и  $3L_{01}$  ( $\chi^2 = 17.05$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.001$ ).

Таким образом, полученные нами данные позволили определить современные северные границы ареалов видов-двойников малярийных комаров *An. beklemishevi*, *An. daciae*, *An. messeae* s. s. и *An. maculipennis*, обитающих в таежных биотопах Карелии. Отмечено продвижение на север комаров *An. beklemishevi* и *An. messeae*. Граница распространения малярийных комаров сместилась от 65 параллели до Северного полярного круга. Хромосомный состав периферийных популяций у полиморфных видов *An. beklemishevi* и *An. messeae* s. s. включает инверсии, типичные для данной ландшафтно-климатической зоны. Хромосомные перестройки в краевых популяциях встречаются преимущественно в гетерозиготах. Очевидно, гетерозиготность по таким инверсиям поддерживается стабилизирующим отбором и способствует сохранению изменчивости на периферии видового ареала. Наличие хромосомных перестроек в периферийных популяциях служит основой для микроэволюционных процессов на краях видовых ареалов и может способствовать дальнейшему расселению комаров в высоких широтах в условиях потепления климата. Наши исследования показали, что процессы адаптивной радиации у малярийных комаров происходят исключительно в лесных сообществах и не выходят за пределы таежной зоны.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-24-00183 “Хромосомный полиморфизм в популяциях видов-двойников малярийных комаров таежной зоны Евразии”, <https://rscf.ru/project/22-24-00183/>.

Исследование одобрено Этическим комитетом Государственного университета просвещения, протокол № 2 от 26 октября 2023 г.

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. Ивантер Э.В. Периферические популяции политического вида и их роль в эволюционном процессе // Принципы экологии. 2012. № 2. С. 72–76. <https://doi.org/10.15393/j1.art.2012.861>
2. Беклемишев В.Н. Экология малярийного комара. М.: Медгиз, 1944. 299 с.
3. Стегний В.Н., Кабанова В.М. Хромосомный анализ малярийных комаров *Anopheles atroparvus* и *A. maculipennis* (Diptera, Culicidae) // Зоол. журн. 1978. Т. 57. № 4. С. 613–619.
4. Artemov G.N., Gordeev M.I., Kokhanenko A.A. et al. A standard photomap of ovarian nurse cell chromosomes and inversion polymorphism in *Anopheles beklemishevi*

- // Parasites and Vectors. 2018. V. 11. № 211. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2657-3>.
5. Artemov G.N., Fedorova V.S., Karagodin D.A. et al. New cytogenetic photomap and molecular diagnostics for the cryptic species of the malaria mosquitoes *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* from Eurasia // Insects. 2021. V. 12. № 9: 835. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/insects12090835>
  6. Corder G.W., Foreman D.I. Nonparametric statistics: A step-by-step approach, 2nd ed. Hoboken, N. Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. 288 p. [https://doi.org/10.1111/insr.12095\\_3](https://doi.org/10.1111/insr.12095_3)
  7. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics // J. Heredity. 1995. V. 86. № 6. P. 485–486. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JHERED.A111627>
  8. Гнатюк Е.П., Крышень А.М., Кузнецов О.Л. Биогеографическая характеристика приграничной Карелии // Тр. Карельского науч. центра Росс. акад. наук. Серия: Биогеография. Петрозаводск, 2011. Вып. 12. С. 12–22.
  9. Перевозкин В.П., Гордеев М.И., Москаев А.В. и др. Распространение и инверсионный полиморфизм комаров Карелии // Генетика. 2012. Т. 48, № 7. С. 806–811.
  10. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1991. 136 с.
  11. Гордеев М.И., Ежов М.Н. Глобальное потепление и изменение хромосомного состава сибирских популяций малярийных комаров // Докл. Акад. наук. 2004. Т. 395, № 4. С. 554–557. <https://doi.org/10.1023/b:dobs.0000025240.84307.f4>
  12. Novikov Yu.M., Vaulin O.V. Expansion of *Anopheles maculipennis* s. s. (Diptera: Culicidae) to northeastern Europe and northwestern Asia: Causes and Consequences // Parasites & Vectors. 2014. V. 7. № 389. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-389>
  13. Гордеев М.И., Темников А.А., Панов В.И. и др. Хромосомная изменчивость в популяциях малярийных комаров в различных ландшафтных зонах Восточной Европы и Южного Урала // Географическая среда и живые системы. 2022. № 4. С. 48–66. <https://doi.org/10.18384/2712-7621-2022-4-48-66>
  14. Brusentsov I.I., Gordeev M.I., Yurchenko A.A. et al. Patterns of genetic differentiation imply distinct phylogeographic history of the mosquito species *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* in Eurasia. Mol. Ecol. 2023. V. 32. № 20. P. 5609–5625. <https://doi.org/10.1111/mec.17127>

## Chromosomal Polymorphism of Malaria Mosquitoes of Karelia and Expansion of Northern Boundaries of Species Areas

A. V. Moskaev<sup>a</sup>, A. G. Bega<sup>a,b</sup>, V. I. Panov<sup>a</sup>, V. P. Perevozkin<sup>c</sup> and M. I. Gordeev<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Federal State University of Education, Moscow region, Mytishchi, 141014 Russia

<sup>b</sup>Vernadskiy Russian State University of National Economyderal region, Moscow, 143907 Russia

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

<sup>d</sup>Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, 634061 Russia

e-mail: \*gordeev\_mikhail@mail.ru

Chromosomal variability in peripheral populations of malaria mosquitoes of the genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) inhabiting the territory of Karelia was studied. The modern northern limits of the ranges of sibling species of malarial mosquitoes *An. beklemishevi*, *An. daciae*, *An. messeae* s. s. and *An. maculipennis* were established. After 2010, the distribution boundary of malaria mosquitoes shifted northward by 170 km, from the 65th parallel to the Arctic Circle. Inversion heterozygotes XL<sub>1</sub>, XL<sub>2</sub>, 2R<sub>2</sub>, 3R<sub>1</sub> and 3R<sub>5</sub> were found in peripheral populations of *An. beklemishevi*. Peripheral populations of *An. messeae* s. s. were homozygous for inversion of sex chromosome XL<sub>1</sub> and differed in the frequencies of autosome inversions from the middle taiga populations. The frequency of heterozygotes for autosomal inversions 2R<sub>1</sub>, 3R<sub>1</sub>, and 3L<sub>1</sub> increased in populations at the edge of the species area. Chromosomal variability in peripheral populations contributes to the dispersal of malaria mosquitoes in high latitudes under warming climate conditions.

**Keywords:** chromosomal polymorphism, marginal populations, area boundaries, malaria mosquitoes, *Anopheles*.

УДК 575.174.015.3:599.742.1

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ ГИБРИДОВ ВОЛКА И ОБЫКНОВЕННОГО ШАКАЛА

© 2024 г. П. А. Казимиров<sup>1, 2, \*</sup>, Ю. С. Белоконов<sup>1</sup>, М. М. Белоконов<sup>1</sup>, А. С. Мишин<sup>3</sup>,  
В. В. Стахеев<sup>4</sup>, Ю. А. Яровенко<sup>5</sup>, А. Ю. Яровенко<sup>5</sup>, Д. В. Политов<sup>1, 2, \*\*</sup>

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

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт охраны окружающей среды, Москва, 117628 Россия

<sup>3</sup>Воронежский государственный природный биосферный заповедник им. В.М. Пескова, Воронеж, 394080 Россия

<sup>4</sup>Институт аридных зон, Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, 344006 Россия

<sup>5</sup>Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала, 367000 Россия

\*e-mail: farenklaw@gmail.com

\*\*e-mail: dmitri\_p@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После доработки 14.12.2023 г.

Принята к публикации 18.12.2023 г.

Приведены результаты генетического анализа 11 фенотипически девиантных особей волка, *Canis lupus* Linnaeus, 1758 sensu lato, из Воронежского государственного природного биосферного заповедника (Черноземная зона европейской части России) и Дагестана (Северный Кавказ, Россия), которые на основании морфологии были идентифицированы как предполагаемые гибриды волка с шакалом. По наследуемой по материнской линии мтДНК (последовательности фрагмента гена цитохрома *b*) и маркерам отцовской линии Y-хромосомным фрагментам *ZfY* не выявлено гибридов волка и шакала первого поколения, исключена также принадлежность исследованных особей к гибридам между разными особями F1 волка и шакала последующих поколений. Однако не исключается принадлежность морфологически атипичных особей R сложным гибридам, например различным вариантам бэккроссов. По результатам анализа набора аутосомных микросателлитных локусов предположительно идентифицирован один гибрид второго поколения. Также получены данные, которые можно рассматривать как следы гибридизации и интрогрессии у нескольких особей, идентифицированных как волки. Есть основания предполагать наличие потока генов между популяциями шакала и волка в южных регионах европейской части России, хотя явных указаний на интрогрессию между этими видами в рассматриваемых случаях не обнаружено. В то же время результаты как генетического, так и краниологического исследований позволяют предполагать гибридизацию волков с собаками на тех же территориях.

**Ключевые слова:** волк, шакал, собака, гибридизация, генетические маркеры.

**DOI:** 10.31857/S0016675824060073 **EDN:** BXSPKF

Волк, *Canis lupus* Linnaeus, 1758 и обыкновенный шакал, *C. aureus* Linnaeus, 1758 — представители семейства псовых, или собачьих (Canidae, отряд Carnivora, класс Mammalia), связанные относительно близким родством. Оба вида относятся к линии волка (род *Canis*, подтриба Canina, триба Canini), однако в пределах современных границ рода *Canis* по данным молекулярной филогении [1] обыкновенный шакал является наиболее дивергировавшим от волка таксоном. В Палеарктике эти виды в настоящее время частично викарируют географически и экологически. При этом волк имеет

циркумполярное и циркумбореальное распространение, встречается в Северной Евразии от Пиренейского полуострова на западе до Тихоокеанского побережья на востоке, и от зоны арктических пустынь и тундры на севере до степей, полупустынь и пустынь на юге, где его исторический ареал был значительно шире современного. В современную эпоху южные популяции волка подверглись существенной фрагментации. Шакал же в историческое время был ограничен в своем распространении частью Юго-Восточной Азии (к западу от Таиланда), Южной Азии (Индостан), югом Средней Азии,

Передней Азией, в Европе же был в значительной мере истреблен или вытеснен и с конца XIX в. встречался лишь на Балканах (страны бывшей Югославии, Греция, Албания, Болгария), где к середине XX в. стал весьма редким. Однако к началу XXI в. шакал продвинулся на север как в Азии, так и в Европе, этот процесс продолжается в настоящее время, так что ареал вида уже включает почти всю Среднюю Азию, южные области Казахстана и значительные территории Европы [2–5].

Происходит активное расширение ареала шакала и в европейской части России. Еще в середине прошлого века на территории современной России присутствие шакала, за редкими исключениями, было ограничено Кавказом и Закавказьем — хищники редко заходили севернее Новороссийска [6]. В настоящее время на юге России, по данным проекта “Млекопитающие России” ([rusmam.ru](http://rusmam.ru)), существуют подтвержденные фотографиями случаи регистрации шакала на всей территории Предкавказья вплоть до Волгограда, в Саратовской, Пензенской, Воронежской, Брянской областях. При рассмотрении наблюдений без приложенных фотографий присутствие шакала фиксируется вплоть до восточной части Оренбургской области. В центральной полосе присутствие шакала зарегистрировано в Московской области и Республике Чувашия. В северных регионах шакал замечен в Псковской, Вологодской, Ленинградской и Архангельской областях, а также в Республике Коми [3]. Одновременно происходит и значительное повышение численности шакала на ранее освоенных им территориях. Так, согласно учетам охотничьих видов, численность шакала в Краснодарском крае с 2005 по 2016 г. возросла более чем в 3 раза [7].

Если заходы шакала в северные регионы выглядят скорее как единичные случаи, которые едва ли смогут привести к появлению на этих территориях устойчивых популяций в ближайшем будущем, то на юге расширение ареала и повышение плотности населения шакала представляют собой устойчивый процесс, сопровождающийся значительным повышением численности хищника. При этом происходит проникновение и закрепление шакала на территориях, ранее занимаемых исключительно волком, что существенно расширяет зону симпатрии и возможности контакта двух видов. Различия в предпочитаемых экологических нишах, низкая напряженность прямой конкуренции за добычу и места для логовищ приводят к тому, что два вида способны сосуществовать в относительной гармонии. При этом шакалы, по всей видимости, все еще предпочитают территории, на которых активны нетерриториальные волки, а не участки, занятые устойчивыми стаями, что было описано ранее [8].

При симпатрии таких относительно близких видов, как волк и обыкновенный шакал, особенно в

условиях не только перестройки ареалов, но и изменения относительной численности, неизбежно возникает вопрос потенциальной гибридизации между видами. Ряд работ, описывающих гибридизацию как волка и собаки, так и волка и койота (как пример гибридизации двух видов диких канид) указывают на сильный эффект дестабилизации популяции (преимущественно за счет отстрела животных) на степень выраженности гибридизации. Играет роль также и соотношение численности. Так, при высокой численности одного из видов изъятая из размножающейся пары особь более вероятно будет замещена представителем того же вида, в то время как при малой численности ее место может занять особь другого вида [9–11]. В случае волков и шакалов на юге Российской Федерации, оба вида являются охотничьими и добываются в больших количествах. Более того, в ряде регионов наблюдается значительное преобладание по численности одного вида над другим (волка над шакалом или шакала над волком) [7]. Таким образом, зона пересечения ареалов волка и шакала должна, в теории, обладать благоприятными условиями для возникновения гибридов.

В частности, подозрения о гибридном происхождении отдельных особей возникают при выявлении особенностей морфологии, не характерных для чистых видов, к которым предположительно принадлежат добытые или наблюдаемые в природе особи. Тем не менее вопрос гибридизации волка с шакалом до сих пор остается слабо разработанным, в особенности это касается генетических исследований. Так, несколько предположительных гибридов волка/собаки с шакалом были добыты на территории Израиля, однако генетические исследования не подтвердили факта гибридизации, при этом по митохондриальным маркерам были обнаружены следы интрогрессии африканского волчьего шакала (*Canis lupaster* Hemprich & Ehrenberg, 1833) [12]. В 2015 г. в Хорватии был зафиксирован первый случай гибридизации шакала с домашней собакой (*C. lupus familiaris* L., 1758), подтвержденный молекулярными методами [2]. Анализ 15 микросателлитных локусов, трех локусов главного комплекса гистосовместимости (МНС), контрольного региона мтДНК и интрона гена *ZfY*, локализованного на Y-хромосоме, выявил две гибридные особи, одна из которых была классифицирована как бэккросс на шакала, и одна являлась бэккроссом на волка. Это свидетельствует, среди прочего, о том, что гибриды между представителями *C. lupus* и *C. aureus* фертильны [2]. В то же время идентификация особей, имеющих фенотип, который на первый взгляд выглядит промежуточным между волком и шакалом, может маркировать и результат гибридизации волка с домашними собаками [13].

В настоящем исследовании мы приводим результаты генетического анализа 11 образцов,

взятых от фенотипически девиантных особей волка, которые на основании морфологии были исходно идентифицированы как гипотетические гибриды волка с шакалом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Характеристика биологического материала*

Десять образцов с территории Воронежского государственного заповедника были собраны в период 2016–2021 гг. одним из авторов (А.С. Мишин). Псовые с нетипичными для волка фенотипами (окрас, волосяной покров, форма головы) единично отмечались на территории Воронежского заповедника начиная с 1990-х гг., с 2013–2017 сформировав устойчивую популяцию, при этом в целом на территории Воронежской области еще в прошлом веке отмечалось много предполагаемых волко-собачьих гибридов [14]. Мы включили в анализ также один образец, взятый Ю.А. Яровенко у особи с промежуточной морфологией, добытой на территории Дахадаевского района Республики Дагестан в феврале 2022 г. Эта особь обликом и окрасом напоминала шакала, была гораздо мельче типичных волков, при этом степень стертости зубов свидетельствовала, что она была по меньшей мере взрослой, а скорее старой. В качестве референтных были использованы фиксированные этанолом образцы тканей четырех особей обыкновенного шакала, добытых в Азовском районе Ростовской области в январе 2022 г. (собраны В.В. Стахеевым). Для выделения ДНК были использованы заспиртованные или высушенные фрагменты тканей или крови, кроме одного образца атипичной морфологии из Воронежского заповедника (№ 2418), который был представлен костными останками. Также в качестве референтных использовались образцы волков и собак из коллекции лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен РАН). Выделение ДНК из полученных образцов проводилось наборами “ДНК-Экстран 2” производства компании “Синтол” (Москва, Россия).

### *Генетический анализ видовой принадлежности*

Первый этап генетического анализа был проведен по унипарентальным маркерам: наследуемому по материнской линии фрагменту митохондриального гена цитохрома *b* (*cytb*) и интронам генов цинковых пальцев *ZfY* и *ZfX*, локализованных на Y- и X-хромосомах соответственно (*ZfY*, таким образом, маркирует отцовскую линию наследования). Для амплификации фрагмента гена *cytb* использовали праймеры MVZ04 и MVZ05 [15] в соответствии с мультиплексным протоколом,

приведенным в работе [13], секвенирование амплифицированных фрагментов проводилось с использованием сервисов компании “Евроген” (Москва, Россия) с использованием праймера MVZ04. Для одновременной амплификации фрагментов *ZfX* и *ZfY* использовались праймеры dZFY1F и dZFY2R [16]. Данная пара праймеров применялась для определения пола анализируемых животных, а также для выявления особей, относящихся к шакалу по отцовской линии, — у представителей *C. aureus* отсутствует имеющаяся у собак и волков инсерция в гене *ZfY*, что позволяет дифференцировать эти виды с помощью простой технологии ПЦР-амплификации и последующего электрофореза. Для подтверждения видового диагноза использовался дополнительный набор праймеров (YintF2, YintR и Yint2-335), разработанный специально для однозначного выявления наличия или отсутствия данной делеции по наличию двух или трех амплифицированных фрагментов [17]. Для считывания результатов ПЦР применялся электрофорез в полиакриламидном геле с использованием размерного стандарта 1кб производства компании “Сибэнзим” (Новосибирск, Россия).

Поскольку комбинация унипарентальных маркеров не может однозначно идентифицировать все классы гибридов, особенно возвратных (бэк-кроссов), был проведен также анализ аутоматических микросателлитных маркеров: 213, 2010, vWf 2079, PEZ03, 2201, 2096, 2140, 2006, 2054, 2168, 2159, 2001, CXX253, АНТ119, CXX250, CXX225, АНТ138, CXX123, CXX204, АНТ126, АНТ106 [18]. Условия ПЦР описаны в исходном источнике и отработаны нами на различных секвенаторах коммерческих сервисов [19], в настоящем исследовании использовался ДНК-анализатор “Нанофор 5” (Синтол).

Анализ микросателлитных маркеров с использованием описанных ранее мультиплексных реакций [18] был проведен для гибридных особей. В качестве референтного набора данных по популяции волков РФ были использованы генотипы 207 особей волков из 19 регионов: республики Адыгея, Калмыкия, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Чувашия, Кабардино-Балкарская, Удмуртская, Чеченская, Краснодарский и Ставропольский край, Калужская, Ленинградская, Нижегородская, Ростовская, Рязанская, Смоленская, Тверская и Тульская области. Для расчета видового происхождения особей была использована программа NewHybrids 1.1 [20] со стандартными параметрами и числом итераций 1000000. Для целей анализа референтные особи были классифицированы как представители чистого вида (волк или шакал). Предполагаемые гибриды, которые по обоим унипарентальным маркерам были определены как волки, были также отмечены как представители волков.

### Морфологический анализ видовой принадлежности

Для проведения краниологического анализа были получены 3D-сканы 10 черепов предполагаемых волко-шакальих гибридов из коллекции Воронежского государственного заповедника. В качестве референсных образцов были использованы сканы черепов волков из коллекции Зоологического музея МГУ им. М.В. Ломоносова (ЗММГУ) и Государственного Дарвиновского музея (ГДМ), а также череп бродячей домашней собаки и череп шакала из коллекции лаборатории исторической экологии ИПЭЭ им. Северцова РАН, предоставленные А.Б. Савинецким. Сканирование черепов проводилось при помощи оптического сканера RangeVision Neo (RangeVision, Москва, Россия). Непосредственно сравнительный анализ черепов методом геометрической морфометрии проводился в пакете Geomorph [21, 22] для среды R [23].

В связи с тем, что не все сканированные черепа имели полную структурную целостность (у одного из черепов из Воронежского заповедника отсутствовали височные дуги), были проведены два независимых морфометрических анализа. Первый был проведен с использованием пяти фиксированных (установленных вручную) опорных точек (наиболее роstralная точка соприкосновения носовых костей, крайние точки надглазничных отростков, наиболее задние точки мышцелков) и 500 сгенерированных автоматически опорных точек. Второй анализ был проведен с использованием девяти фиксированных опорных точек (приведенные выше, а также наиболее внешние точки височных дуг в месте их максимальной ширины, начальная и наиболее задняя точки сагиттального гребня) и 2000 сгенерированных автоматически опорных точек. На основе полученных точек была проведена нормализация черепов по размеру и анализ методом главных компонент (PCA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Генетический анализ видовой принадлежности

Генотипы по фрагменту гена цитохрома *b* были получены для 11 предполагаемых гибридов, четырех шакалов, двух домашних собак и пяти волков из коллекции лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова ИОГен РАН. Полученные в рамках исследования последовательности депонированы в GenBank под номерами PP16645–PP16666. Длина полученных фрагментов после выравнивания составила 320–381 пн. По результатам анализа BLAST по базам данных GeneBank NCBI все 11 предположительно гибридных особей, все исследованные волки и домашние собаки с вероятностью 99.6–100% по материнской линии оказались представителями вида *Canis lupus s. l.*

(то есть волк или домашняя собака) и не являются носителями митохондриальных гаплотипов обыкновенного шакала (табл. 1). Четыре референсных образца шакалов имели гаплотипы *cytb*, которые также с высокой вероятностью (98.498.7%) относились к виду *Canis aureus*.

По результатам молекулярного определения пола с использованием праймеров dZFY1F и dZFY2R среди предполагаемых гибридов было выявлено шесть самцов и четыре самки (качество ДНК образца 2418 не позволило получить результаты по ядерным маркерам и он был исключен из дальнейшего анализа). Все самцы по длине амплифицируемого фрагмента были определены как принадлежащие к *C. lupus s. l.* Видовая идентификация была подтверждена с использованием праймеров YintF2, YintR и Yint2-335. Функциональность обоих наборов праймеров была проверена на четырех образцах волка и четырех образцах шакала (по два самца и две самки), на которых половая и видовая принадлежность, установленная генетическим анализом, соответствовала исходным данным о видовых диагнозах (рис 1).

По результатам анализа микросателлитных маркеров три из четырех самок предполагаемых гибридов были определены как представители *Canis lupus* с вероятностью 88.7–99.6%. Одна из самок (проба 2420CLA, отобранная в Воронежском заповеднике в сентябре 2021 г.) была определена как гибрид второго поколения (F2) с вероятностью 79%, при этом большая доля оставшейся вероятности приходилась на отнесение ее к *Canis aureus* (19,2%). Данная самка несла по трем локусам (2201, АНТ138, СХХ204) аллели, не присутствующие в референсной популяции волков. Однако у четырех имеющихся шакалов этих аллелей также не обнаруживалось. Для четырех самцов из предполагаемых гибридов (пробы 2413CL–2415CL и 2421CL) наблюдалась низкая вероятность отнесения к *C. lupus*, вплоть до 53.7–78.2%. При этом наибольшая оставшаяся вероятность (16.3–33.6%) приходилась на гибрид второго поколения (F2). Два самца (пробы 2413CL и 2414CL) несли каждый по одному локусу (СХХ204 и АНТ106 соответственно), в которых присутствовали аллели, отсутствующие в референсной популяции волков. Один из этих аллелей (в локусе СХХ204) присутствовал у одной из особей шакала (проба 2423СА).

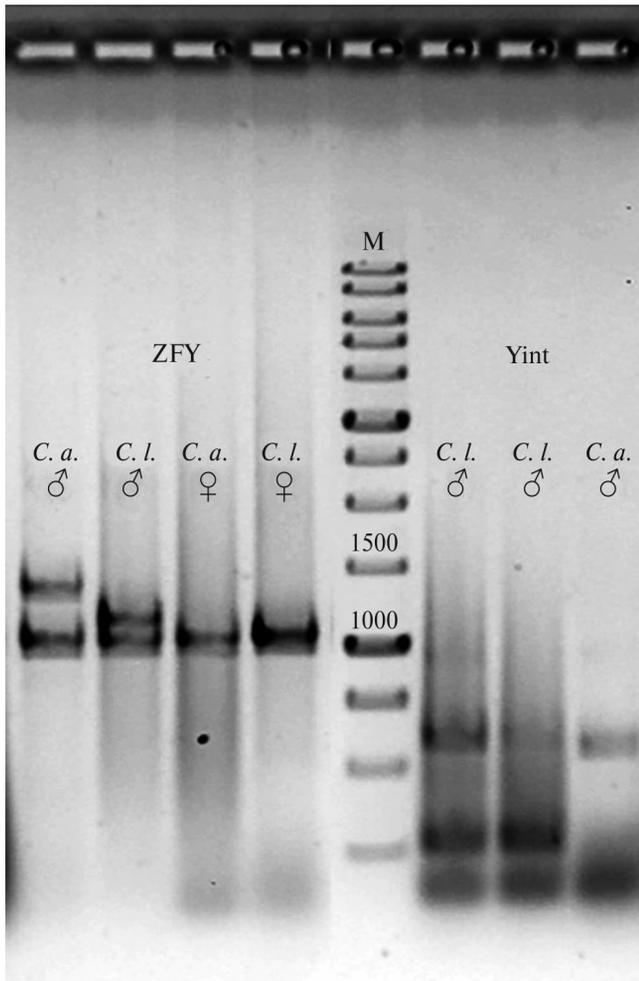
### Морфологический анализ видовой принадлежности

По результатам первого краниометрического анализа наблюдалось удаление черепа собаки от общей группы по первой главной компоненте (32.81% изменчивости). При этом один из черепов из Воронежского заповедника (датированный 2019 г.) находился по первой компоненте дальше, чем череп собаки. Еще один череп из Воронежского

Таблица 1. Морфологические и генетические диагнозы образцов особей рода *Canis*

Образец	Регион	Диагноз (фенотип)	Диагноз мтДНК	Диагноз (ZfY)	Диагноз (nSSR)	<i>aureus</i>	<i>lupus</i>	F1	F2	<i>lupus</i> ВК	<i>aureus</i> ВК
2410CL	Республика Дагестан	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.9%	<i>lupus</i>	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.95243</b>	0.00124	0.03246	0.00013	0.01374
2412CL	Воронежская обл.	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.9%	N/A(самка)	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.98841</b>	0.00000	0.00689	0.00000	0.00470
2413CL	То же	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.9%	<i>lupus</i>	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.72693</b>	0.00038	0.22797	0.00014	0.04457
2414CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.7%	<i>lupus</i>	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.53735</b>	0.06157	0.33663	0.00968	0.05476
2415CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 100%	<i>lupus</i>	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.78208</b>	0.00006	0.18939	0.00001	0.02846
2416CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 100%	самка	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.99691</b>	0.00000	0.00153	0.00000	0.00157
2417CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.8%	N/A(самка)	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.88760</b>	0.00017	0.09915	0.00014	0.01294
2418CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.6%	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2419CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 99.8%	<i>lupus</i>	<i>C. lupus</i>	0.00000	<b>0.98280</b>	0.00001	0.01436	0.00000	0.00283
2420CLA	».	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 100%	N/A(самка)	F2	0.19228	0.00000	0.00000	<b>0.79064</b>	0.01706	0.00001
2421CL	»	<i>lupus</i> x <i>aureus</i>	<i>lupus</i> 100%	<i>lupus</i>	<i>C. lupus</i>	0.04565	<b>0.77287</b>	0.00064	0.16304	0.00521	0.01260
2422CA	Ростовская обл.	<i>aureus</i>	<i>aureus</i> 98.5%	<i>aureus</i>	<i>C. aureus</i>	<b>0.94799</b>	0.00005	0.00027	0.02530	0.02637	0.00003
2423CA	То же	<i>aureus</i>	<i>aureus</i> 98.7%	N/A(самка)	<i>C. aureus</i>	<b>0.96959</b>	0.00000	0.00017	0.00879	0.02146	0.00000
2424CA	»	<i>aureus</i>	<i>aureus</i> 98.5%	N/A(самка)	<i>C. aureus</i>	<b>0.98375</b>	0.00000	0.00026	0.00288	0.01311	0.00000
2425CA	»	<i>aureus</i>	<i>aureus</i> 98.4%	<i>aureus</i>	<i>C. aureus</i>	<b>0.92954</b>	0.00000	0.00277	0.02177	0.04590	0.00003

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения, соответствующие наиболее вероятным диагнозам. nSSR – ядерные микросателлитные локусы. *lupus*ВК – бэккросс на волка; *aureus*ВК – бэккросс на шакала; N/A – нет данных.



**Рис. 1.** Результат электрофореза ПЦР-продуктов, полученных с использованием наборов праймеров dZFY1F/dZFY2R и YintF2/YintR/Yint2-335. *C. a.* – *Canis aureus*, *C. l.* – *Canis lupus*, М – размерный стандарт 1кб, длины фрагментов в пн.

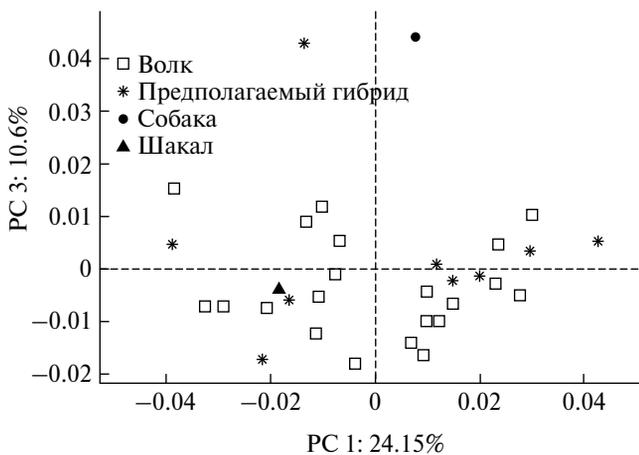
заповедника (датированный 1990 г.) находился по первой компоненте между черепом собаки и ближайшим к ней черепом волка.

По результатам второго анализа (рис. 2) наблюдалось удаление черепа шакала от остальных черепов по комбинации первой и второй компонент (24.15% и 18.77% изменчивости соответственно). При этом ни один из черепов предполагаемых гибридов не был ближе к черепу шакала, чем к какому-либо из черепов волков. По третьей компоненте (10.6% изменчивости) наблюдалось значительное удаление черепа собаки и одного из черепов предполагаемых гибридов (череп 02-2021).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Таким образом, по результатам работы не было выявлено гибридов волка и шакала первого поколения, также комбинация унипарентальных маркеров позволила исключить принадлежность исследованных особей к гибридам между разными особями F1 волка и шакала последующих поколений. Однако логика этого подхода для установления окончательного диагноза вызывает сомнения. Во-первых, самки не могут быть проанализированы по Y-хромосомным маркерам. Во-вторых, особи с мтДНК и тяжелым фрагментом *ZfY*, указывающим на принадлежность к волкам, не могут быть результатом скрещивания волка с шакалом только если мы рассматриваем первое поколение (F1) или последующие поколения размножения гибридных особей F1 внутри себя. Если же в систему скрещивания вовлечены возвратные скрещивания, то особи, определенные по митохондриальным и Y-хромосомным маркерам как волки, могут быть возвратными гибридами второго и последующих поколений. Так, например, потомок-самка от родителей ♀*lupus* × ♂*aureus* будет с характерным для родительского вида материнским вариантом, а ее братья-самцы будут с мтДНК волка и Y-хромосомой шакала. Однако уже в следующем поколении потомки этой самки – самцы-бэкрессы на волка (♂*lupus*) будут иметь ту же комбинацию гаплотипов *cytb* и *ZfY*, что и “чистые” волки. Подобная ситуация может возникать также и при некоторых комбинациях третьего и последующих поколений бэкрессов. Таким образом, в данном контексте не исключаются сложные гибриды.

По результатам анализа микросателлитных маркеров был предположительно идентифицирован один гибрид второго поколения, также получены данные, которые можно рассматривать как следы гибридизации у нескольких особей, идентифицированных как волки. Таким образом, есть некоторые основания предполагать наличие потока генов между популяциями шакала и волка в южных регионах европейской части России. Однако четких указаний на интрогрессию волка и



**Рис. 2.** Результаты краниометрического анализа по 3D-моделям методом главных компонент.

шакала в рассматриваемых случаях не обнаружено. В то же время результаты как генетического, так и краниологического исследований позволяют предполагать гибридизацию волков с собаками на тех же территориях. Уклоняющийся, нетипичный для волка, облик выявляемых особей рода *Canis* с большей вероятностью может отражать поток генов между волком и собакой, либо между шакалом и собакой, либо между волком и шакалом. Однако последний вариант менее вероятен, он крайне плохо документирован в Европе, нет надежных данных и по азиатской части зоны симпатрии двух диких видов псовых. Сомнения в успешности гибридизации волка и шакала, и тем более широкой интрогрессии между ними, остаются, хотя хорошо документировано, что каждый из этих диких видов успешно гибридизирует с собакой [2, 24]. Как отмечалось выше, это соответствует современным представлениям, что волк и обыкновенный шакал не являются ближайшими родственными таксонами.

Что касается Воронежского заповедника, следует отметить, что волки, вновь заселившие заповедник в 1970-е гг. после прекращения плановой борьбы с ними, обладали типичными морфологическими и этологическими признаками, характерными для вида. Хотя иногда их осторожно именовали “высококровными по волку гибридами”. При этом, на территории Воронежской области во второй половине прошлого века отмечалось много предполагаемых волко-собачьих гибридов [13]. Единственный до последнего десятилетия случай появления псового с нетипичными для волка фенотипом на территории Воронежского заповедника отмечен в 1990 г. Вероятная гибридизация с собакой могла иметь место в 2013 г., когда в марте была встречена волчица, сопровождаемая крупным кобелем. Применение фотоловушек с 2017 г. позволило ежегодно регистрировать хищников с нетипичным для волка внешним видом (окрас, особенности волосяного покрова, форма головы), при этом они проявляли типично волчье поведение и избегали человека.

Стоит отметить, что в настоящей работе как в генетической, так и в краниологической части исследования, набор референсных образцов шакалов был весьма ограничен. В связи с этим очевидны необходимость расширения набора данных по генотипам, морфологии и краниологии шакала и дальнейшая отработка методов идентификации гибридов и мониторинга событий гибридизации волка, собаки и шакала, которые становятся все более частыми в связи с расширением ареала шакала в европейской части России и в целом в Европе. Экспансия шакала вызывает беспокойство природоохранных организаций, поскольку в большинстве случаев он ведет себя как инвазивный вид, негативно влияя на биоразнообразие в

экосистемах, в которые внедряется [5]. Генетический мониторинг популяций волка должен включать не только выявление так называемых “волкособов”, но и тестирование на волко-шакалов. В частности, весьма многообещающим выглядит использование не только микросателлитов [4], но и панелей однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Однако до настоящего времени широкого тестирования на обыкновенных шакалах панелей SNP, исходно разрабатываемых для выявления волко-собачьих гибридов, не проводилось [24].

Авторы искренне благодарят А.Б. Савинецкого, любезно предоставившего череп собаки и давшего ценные консультации о сравнительном анализе морфологии и анатомии канид.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00635, <https://rscf.ru/project/23-24-00635/>.

Этические нормы обращения с животными не нарушались, ни одно животное не было добыто специально для данного исследования. Все образцы взяты от законно добытых особей. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog // *Nature*. 2005. V. 438. № 7069. P. 803–819. <https://doi.org/10.1038/nature04338>
2. Galov A., Fabbri E., Caniglia R. et al. First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers // *Royal Society Open Science*. 2015. V. 2. № 12. <https://doi.org/10.1098/rsos.150450>
3. Rykov A.M., Kuznetsova A.S., Tirronen K.F. The first record of the golden jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) in the Russian Subarctic // *Polar Biology*. 2022. V. 45. № 5. P. 965–970.
4. Stronen A.V., Bartol M., Boljite B. et al. “Passive surveillance” across species with cross-amplifying molecular markers: the potential of wolf (*Canis lupus*) genetic monitoring in tracking golden jackal (*C. aureus*) colonization and hybridization // *Hystrix, the Italian J. Mammalogy*. 2020. V. 31. № 1. P. 74–76. <http://dx.doi.org/10.4404/hystrix-00259-2019>
5. Trouwborst A., Krofel M., Linnell J.D.C. Legal implications of range expansions in a

- terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe // Biodiversity and Conservation. 2015. V. 24. № 10. P. 2593–2610. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0948-y>
6. Новиков Г.А. Хищные млекопитающие фауны СССР. М.; Л.: АН СССР, 1956. 294 с.
  7. Волк. Происхождение, систематика, морфология, экология / Под ред. Бибикова Д.И. М.: Наука, 1985. 606 с.
  8. Кудактин А.Н., Яровенко Ю.А., Яровенко А.Ю. Современное распространение и экология шакала обыкновенного *Canis aureus* (L., 1758) в России и на Кавказе // Вестник охотоведенья. 2019. Т. 16. № 1, С. 22–28.
  9. Rutledge L.Y., White B.N., Row J.R., Patterson B.R. Intense harvesting of eastern wolves facilitated hybridization with coyotes // Ecol. Evol. 2012. V. 2. № 1. P. 19–33. <https://doi.org/10.1002%2Fec3.61>
  10. Bohling J.H., Waits L. P. Factors influencing red wolf–coyote hybridization in eastern North Carolina, USA // Biol. Conservation. 2015. V. 184. P. 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.013>
  11. Leonard J.A., Echegaray J., Randi E., Vila C. Impact of hybridization with domestic dogs on the conservation of wild canids // Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation / Ed. Gompper M.E., Oxford: Oxford Univ. Press, 2014. P. 170–184.
  12. Barash A., Preiss-Bloom S., Machluf Y. et al. Possible origins and implications of atypical morphologies and domestication-like traits in wild golden jackals (*Canis aureus*) // Sci. Reports. 2023. V. 13:7388. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34533-w>
  13. Хейдорова Е.Э., Шнак А.В., Гомель К.В. и др. Молекулярно-генетическая идентификация инвазивного вида – шакала азиатского (*Canis aureus*) на территории Беларуси // Докл. Нац. академии наук Беларуси. 2018. Т. 62. № 1. С. 86–92.
  14. Рябов Л.С. Волки Черноземья. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1993. 168 с.
  15. Smith M.F., Patton J.L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae) // Mol. Biol. Evol. 1991. V. 8. № 1. P. 85–103. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040638>
  16. Boonyaparakob U., Homsavart S., Noosud J., Tungtrakonpoung R. Cloning and comparative analysis of zinc-finger protein gene on Y-chromosome (ZFY) between Thai Bangkaew dog and other Thai canids // Agriculture and Nat. Resources. 2017. V. 51. № 3. P. 212–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anres.2016.12.007>
  17. Galov A., Sindjic M., Gomercic T. et al. PCR-based Y chromosome marker for discriminating between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis lupus familiaris*) paternal ancestry // Conservation Genet. Resources. 2014. V. 6. № 2. P. 275–277. <https://doi.org/10.1007/s12686-013-0110-7>
  18. Akesson M., Liberg O., Sand H. et al. Genetic rescue in a severely inbred wolf population // Mol. Ecol. 2016. V. 25. № 19. P. 4745–4756. <https://doi.org/10.1111/mec.13797>
  19. Казимиров П.А., Леонтьев С.В., Нечаева А.В. и др. Популяционно-генетическая структура степного волка России и Казахстана по микросателлитным локусам // Генетика. 2022. Т. 58. № 11. С. 1261–1272. <https://doi.org/10.31857/S0016675822110042>
  20. Anderson E., Thompson E. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data // Genetics. 2002. V. 160. № 3. P. 1217–1229. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.3.1217>
  21. Adams D.C., Collyer M.L., Kaliontzopoulou A., Baken E.K. Geomorph: Software for Geometric Morphometric Analyses. R package version 4.0.6. 2023. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>
  22. Collyer M.L., Adams D.C. {RRPP}: Linear model evaluation with randomized residuals in a permutation procedure // Meth. Ecol. Evol. 2023. V. 9. № 2. P. 1772–1779. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13029>
  23. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing // 2022. <https://www.R-project.org>
  24. Harmoinen J., von Thaden A., Aspi J. et al. Reliable wolf-dog hybrid detection in Europe using a reduced SNP panel developed for non-invasively collected samples // BMC Genomics. 2021. V. 22:473. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07761-5>

## Genetic Identification of Putative Hybrids Between Grey Wolf and Golden Jackal

P. A. Kazimirov<sup>a, b, \*</sup>, Yu. S. Belokon<sup>a</sup>, M. M. Белоконов<sup>a</sup>, A. S. Mishin<sup>c</sup>,  
V. V. Stakheev<sup>d</sup>, Yu. A. Yarovenko<sup>e</sup>, A. Yu. Yarovenko<sup>e</sup>, D. V. Politov<sup>a, b, \*\*</sup>

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

<sup>b</sup>*All-Russian Research Institute for Environmental Protection, Moscow, 117628 Russia*

<sup>c</sup>*Peskov Voronezhsky State Nature Biosphere Reserve, Voronezh, 394080 Russia*

<sup>d</sup>*Institute of Arid Zones, South Scientific Centre Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

<sup>e</sup>*Caspian Institute of Biological Resources, Dagestan Federal Research Centre Russian Academy of Sciences,  
Makhachkala, 367000 Russia*

*\*e-mail: farenklaw@gmail.com*

*\*\*e-mail: dmitri\_p@inbox.ru*

We describe the results of genetic analysis of 11 phenotypically deviant individuals of grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) sensu lato collected in Voronezh State Nature Biosphere Reserve (Chernozem zone of European Russia) and Dagestan (Northern Caucasus, Russia) putatively identified morphologically as hybrids between grey wolf and golden jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758). By means of maternally inherited mtDNA (sequences of cytochrome b gene fragment) and paternal lineage markers ZfY no F1 wolf-jackal hybrids were identified. As well, possibility of classification of the studied individuals to next generation hybrids from crosses between different wolf-jackal F1s. However, attribution of these animals to complex hybrids such as various backcrosses cannot be rejected. From the results of analysis by a set of autosomal microsatellite loci we putatively diagnosed a single F2 hybrid. As well, we obtained data that can be considered as traces of hybridization between wolf and jackal in southern regions of European Russia, albeit direct indications of introgression between these species not found. At the same time, the results of both genetic and craniological studies could be interpreted as indication to hybridization between wolves and domestic dogs on the same territories.

**Keywords:** wolf, jackal, dog, hybridization, genetic markers.

УДК 575.174:599.9

## ПАЛЕОАЗИАТСКИЙ СУБСТРАТ В ГЕНОФОНДЕ КОРЯКОВ ПО ДАННЫМ О ПОЛИМОРФИЗМЕ АУТОСОМНЫХ SNP И ГАПЛОГРУППАМ Y-ХРОМОСОМЫ

© 2024 г. В. Н. Харьков<sup>1, \*</sup>, Н. А. Колесников<sup>1</sup>, А. А. Зарубин<sup>1</sup>, Л. В. Валихова<sup>1</sup>,  
И. Ю. Хитринская<sup>1</sup>, М. И. Воевода<sup>2</sup>, М. А. Губина<sup>3</sup>, А. Л. Сухомясова<sup>4</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

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,  
Новосибирск, 630060 Россия

<sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>4</sup>Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677000 Россия

\*e-mail: vladimir.kharkov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 12.09.2023 г.

После доработки 17.01.2024 г.

Принята к публикации 12.02.2024 г.

Исследован генофонд коряков, в сравнении с другими дальневосточными и сибирскими народами по полногеномной панели аутомных однонуклеотидных полиморфных маркеров и маркерам Y-хромосомы. Результаты анализа частот аутомных SNP различными методами, сходство по составу гаплогрупп Y-хромосомы и YSTR-гаплотипов свидетельствуют, что генофонд коряков максимально близок к чукотскому и сформировался в результате объединения нескольких групп, предки которых перемещались с территории современной Якутии и Приамурья. Две доминирующие гаплогруппы Y-хромосомы у коряков с различными сублиниями кластеров гаплотипов демонстрируют их контакты с чукчами, эвенками, юкагирами и эскимосами. Анализ состава генетических компонент и IBD-блоков на аутомомах свидетельствуют о максимальной генетической близости коряков с чукчами. Среди сибирских популяций чукчи, коряки и нивхи формируют отдельный кластер от основной группы сибирских популяций, при этом чукчи и коряки являются более близкородственными. Дальневосточные популяции разделены в полном соответствии с географической локализацией на северную группу (чукчей и коряков) и южную, включающую нивхов и удэгейцев. При более детальном анализе компонентного состава генофондов в некоторых популяциях выделяются специфичные для них компоненты. Выделение таких компонент связано с эффектами основателя и сдвигом частот аллелей для этих популяций. Коряки и чукчи являются одним из ярких примеров давнего генетического родства. В их популяциях обнаружены максимальные значения уровня геномного инбридинга  $F_{ROH} > 1.5$  (0.0422, 0.0409), что закономерно в связи с их относительной изолированностью.

*Ключевые слова:* генофонд, популяция, генетическое разнообразие, генетические компоненты, Y-хромосома, коряки.

DOI: 10.31857/S0016675824060088 EDN: BXRSHR

Коряки — один из коренных народов северной части полуострова Камчатка. Большинство из них проживает компактно в Камчатском крае, а также в Магаданской области и Чукотском автономном округе России. Общая численность по данным переписи 2020 г. составляет 7485 человек. Основные группы коряков: береговые, оседлые (нымыланы), оленные, кочевые (чавчувены). В антропологическом отношении коряки вместе с чукчами,

эскимосами, алеутами и ительменами относятся к арктической расе [1–3].

Коряки, являясь коренными обитателями северо-восточной части Тихоокеанского побережья России, составляют одно из этнических подразделений северо-восточных палеоазиатов, сложившееся на основе внутриконтинентальных культурных традиций неолитических охотников [4]. Этническая история коряков — это прежде всего история

их взаимоотношений с соседними народами. Памятники устного народного творчества коряков свидетельствуют об их тесных контактах с эскимосами, чукчами, эвенками, юкагирами, ительменами. В далекое прошлое уходят своими корнями корякско-эскимосские связи. И.С. Вдовин, основываясь на данных топонимики, предполагал, что эскимосы в далеком прошлом жили по восточному берегу Камчатки и даже на побережье Охотского моря. Осваивая тихоокеанское побережье, коряки одну часть эскимосов ассимилировали, другую вытеснили с побережья [5].

В неолите на северо-востоке Азии складывались два очага автохтонного развития культур. Один из них складывался в Северном Приохотье, другой на Камчатке [6]. Анализ археологических материалов с учетом данных этнографии и лингвистики свидетельствует об особом генезисе корякско-палеоазиатской (корякско-чукотской) общности. Около четырех тысяч лет назад начинается интенсивное передвижение континентальных охотников на оленей и рыболовов с верховьев рек Яна, Армань, Ола, Яма, Гижига на побережье Охотского моря. Этнически приморская культура северного побережья Охотского моря определяется как древнекорякская. Активное продвижение протокоряков вдоль северо-западного побережья Камчатки началось в I тыс. до н.э., со времени сложения приморской экономики. В последние века до н. э. — первые века н. э. древнекорякская культура развилась в специализированную культуру морских зверобоев. В ходе её развития произошло формирование корякской этнической общности [6].

Общностью происхождения, антропологического типа, сходными чертами материальной и духовной культуры, едиными основами фонетики, грамматики и лексики языков коряки связаны с чукчами. Наряду с этим были и существенные различия, которые развивались на протяжении длительного времени и привели, в конце концов, к их этническому и языковому обособлению. Определенную роль в этом процессе сыграли юкагиры. Вероятно, они появились в долине р. Анадырь в XIV–XV вв. в результате давления со стороны тунгусов и якутов. Юкагирский клин отделил коряков от чукчей. Историческая обстановка последующих веков способствовала не только дальнейшему формированию особенностей, отличающих коряков от чукчей, но и надолго сделала их врагами [7].

Со второй половины XVIII в., после установления мирных отношений береговых коряков с русскими, начинается постепенное сближение двух народов. На Охотском побережье распространяется русский язык, растёт число смешанных браков. В XIX в. контакты коряков с соседями ещё более расширяются. Сильное культурное влияние ительменов испытывают карагинцы, паланцы. Начинается сближение северных групп чавчуменов с

оленными чукчами. Заметно ускорилось обрусение коряков западного берега Камчатки. С 30-х гг. XIX в. наметился стабильный рост численности коряков [8].

Изучение генетического разнообразия населения Дальнего Востока, Чукотки и Камчатки в последние годы ведется различными коллективами [9–11]. При этом генетика коряков была в последние годы охарактеризована в разных статьях на большом массиве популяционных выборок, без подробного описания специфики генофондов коряков и чукчей. Данные были получены генотипированием полных геномов [11], различных гаплогрупп Y-хромосомы [9, 10, 13–15] и мтДНК [11, 16–18].

Развитие новых подходов генотипирования и технологий биоинформационного анализа за последние несколько лет позволило перейти на более высокую ступень изучения генетической структуры популяций человека, проводить высокоразрешающие исследования и сравнительный анализ их генетического разнообразия. Цель настоящего исследования — комплексный анализ структуры генофонда коряков и реконструкция их происхождения в контексте генетических особенностей коренного населения Дальнего Востока и Восточной Сибири. Для решения вопросов генетической близости коряков с другими коренными народами было выполнено генотипирование широкого геномного набора аутосомных маркеров с помощью высокоплотных биочипов, а также расширенного набора SNP и STR-маркеров Y-хромосомы у различных этнических групп: коряков, чукчей, нивхов, удэгейцев, якутов, эвенков, эвенов, юкагиров, тувинцев, южных алтайцев, сибирских татар, кетовихантов. Это дает возможность более подробно охарактеризовать формирование генофонда коряков и его взаимосвязь с различными этносами Дальнего Востока и Сибири.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования составили образцы ДНК мужчин и женщин коряков из сел Карага и Тыллат Карагинского района Корякского округа. Забор первичного биологического материала (венозной крови) у доноров проводили с соблюдением процедуры письменного информированного согласия на проведение исследования. На каждого донора составлялась анкета с краткой родословной, указанием этнической принадлежности и мест рождения предков. Индивида относили к данной этнической группе на основании его собственной этнической идентификации, его родителей и места рождения.

Для генотипирования на микроматрицах аутосомных SNP были использованы образцы ДНК из различных популяций коренного населения

Дальнего Востока и Сибири: коряки ( $N = 20$ ), чукчи (пос. Лорино, Сиреники, Янаркот и Новое Чаплино Чукотского автономного округа, относятся к береговой группе,  $N = 25$ ), нивхи (пос. Некрасовка и Москальво Охинского района Сахалинской области,  $N=13$ ), удэгейцы (с. Красный Яр, Пожарского р-на и с. Агзу Тернейского района Приморского края,  $N = 15$ ), якуты (пос. Чериктей Усть-Алданского улуса Республики Саха,  $N = 22$ ), эвенки из Якутии ( $N = 25$ ) и Забайкалья (пос. Чара Каларского р-на, с. Моклакан и с. Тупик Тунгиро-Олёкминского р-на Читинской области,  $N = 25$ ), томские татары (пос. Черная Речка, пос. Эушта и пос. Тахтамышево Томского р-на,  $N = 20$ ), тувинцы (с. Тээли Бай-Тайгинского кожууна,  $N = 28$ ), чулымцы (пос. Тегульдэт, д. Новошумилово, д. Куяновская Гарь Томской области, д. Пасечное, д. Чиндат Тюхтетского района Красноярского края,  $N = 22$ ), хакасы (сагайцы Таштыпского р-на,  $N = 29$  и качинцы Широинского р-на,  $N = 26$ ), южные алтайцы (с. Бешпельтир Чемальского р-на,  $N = 24$  и с. Кулада Онгудайский р-на,  $N = 25$ ), кеты (п. Келлог Туруханского р-на Красноярского края,  $N = 15$ ), ханты (с. Казым Белоярского р-на,  $N = 30$  и д. Русскинская Сургутского р-на,  $N = 26$ ). Данные широкогеномного генотипирования были получены с использованием микрочипов Infinium Multi-Ethnic Global-8 (Illumina) для SNP генотипирования, включающего свыше 1.7 миллиона маркеров.

Для анализа Y-хромосомных гаплогрупп были использованы 33 образца мужчин коряков. Для сравнения по гаплогруппам Y-хромосомы и спектру гаплотипов также были использованы все образцы мужчин из указанных выше популяционных выборок.

Кластеризация массива генотипов аутосомных SNP и контроль качества выполнялись с использованием протокола, разработанного Guo et al. [19] с использованием GenomeStudio [20] (модуль генотипирования v2.0.3), программного пакета компании Illumina. Для фильтрации, нормализации и расчёта стандартных геномных статистик и показателей оптимальным показал себя стандартный набор программ, включающий vcftools, bcftools, и plink. Для анализа идентичных по происхождению блоков сцепления использовали алгоритм Refined IBD [21], показывающий более точные результаты по сравнению с встроенными в plink алгоритмами. Предварительно генотипы были фазированы с использованием программного обеспечения Beagle 5.1 [22]. Для сравнения популяций были получены суммы средних длин идентичных по происхождению блоков (сегментов IBD – Identical by descent) между парами индивидов.

Для анализа генетических взаимоотношений между популяциями использовали метод главных компонент (PCA – Principal components analysis) и

t-SNE [23, 24]. Для анализа компонентного состава и определения метисации примесей у отдельных индивидов и популяций была использована методика NGSadmix [25] и программа Admixture [26, 27].

Для изучения состава и структуры гаплогрупп Y-хромосомы в исследование были включены две системы генетических маркеров: диаллельных локусов, представленных SNP, и полиаллельных высоковариабельных микросателлитов (YSTR). С помощью 589 SNP-маркеров определяли принадлежность образцов этносов к различным гаплогруппам. При генотипировании отдельных сублиний у относящихся к ним образцов использовали только специфичные для них основные и терминальные YSNP. Классификация гаплогрупп дана в соответствии с данными Международного общества генетической генеалогии [28]. Анализ STR-гаплотипов внутри гаплогрупп проводили с применением 45 микросателлитных маркеров нерекombинирующей части Y-хромосомы (YSTR) (DYS19, 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 426, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 442, 444, 445, 448, 449, 456, 458, 460, 462, 481, 504, 505, 518, 525, 531, 533, 537, 552, 570, 576, 635, 643, YCAIIa, YCAIIb, GATA H4.1, Y-GATA-A10, GGAAT1B07). STR-маркеры генотипировали с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3730. Генотипирование SNP-маркеров Y-хромосомы проводили с помощью ПЦР и последующего анализа фрагментов ДНК с помощью ПДРФ. Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием “Медицинская геномика” (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ). Построение медианных сетей гаплотипов Y-хромосомы проводили с использованием программы Network v 10.2.0.0 (Fluxus Technology Ltd.; www.fluxus-engineering.com) по методу медианных сетей Бандельта [29].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий массив данных, полученный в результате генотипирования на высокоплотных микроматрицах аутосомных SNP в выборках коряков, чукчей, нивхов, удэгейцев и других коренных сибирских народов, позволяет подробно описать генофонд исследованных выборок. Дополнительный анализ состава гаплогрупп Y-хромосомы с их детальным разделением на специфичные сублинии с широким набором специфичных SNP и различия по YSTR-гаплотипам позволяют более точно описать молекулярно-филогенетическую структуру отдельных гаплогрупп Y-хромосомы в исследованных популяционных выборках.

После обработки данных по результатам микрочипового исследования для фильтрации

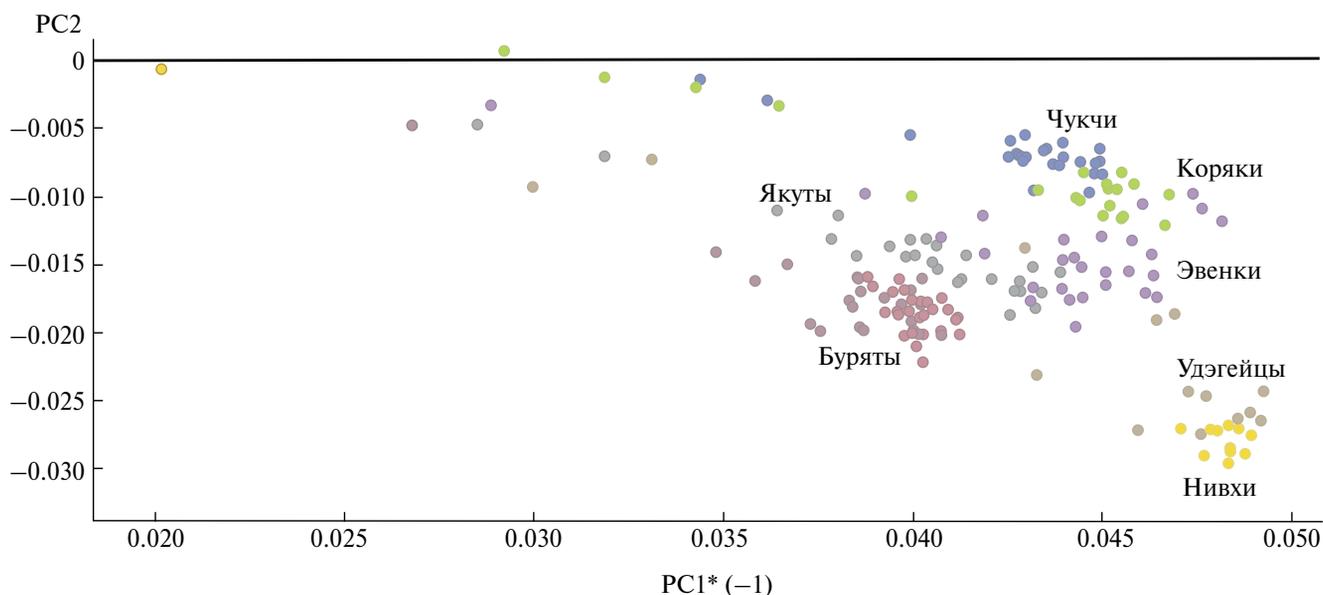
прогенотипированных образцов и проведения дальнейших расчетов был проведён поиск среди коряков метисов с использованием программы NGSadmix. Алгоритм этой программы дает возможность определять соотношение предковых компонент по данным NGS с относительно малой глубиной покрытия. Принцип расчетов аналогичен другим программам, таким как FRAPPE и Admixture, но NGSadmix в отличие от них эффективно работает, когда имеется статистическая неточность в отдельных генотипах. Метод NGSadmix на сформированном нами массиве данных показал, что большинство обследованных коряков не имеют метисации, что полностью соответствует данным анкетирования ДНК-доноров. Метисация с удмуртами выявлена у пяти прогенотипированных мужчин коряков. Они принадлежат к трем различным европейским Y-хромосомным гаплогруппам: G2a1a1a1-Z6638 ( $N = 1$ ), R1b1a1b-L407 ( $N = 1$ ), R1a1a1b1a2b3a-CTS3402 ( $N = 3$ ). Доля европейского компонента в геномах этих образцов существенно различается, что свидетельствует о разной глубине поколений, в которых происходили межэтнические браки. Значительная метисация с корейцами обнаружена у одного мужчины. Его Y-хромосома относится к восточно-азиатской гаплогруппе O1b2a-F1942. Этот образец был исключен из общего массива.

Полученные данные о частотах аутомных SNP в исследованных образцах были использованы для выяснения генетических взаимоотношений между обследованными популяционными выборками. Для анализа генетических различий на индивидуальном уровне и выявления

генетических компонент были применены алгоритмы PCA и Admixture.

#### *Генетические взаимоотношения коряков с другими популяциями Дальнего Востока*

В процессе обработки данных методом главных компонент частот аутомных SNP на уровне отдельных образцов дальневосточные популяции на общем графике были достаточно близко расположены друг к другу. Для более точной визуализации отдельных образцов почти все сибирские популяции были убраны из расчетов для более четкого представления результатов на рисунке, за исключением бурятов, якутов и якутских эвенков (рис. 1). Метод PCA дифференцирует все этносы на несколько групп генетически и географически близких популяций. Кроме коряков несколько образцов чукчей, удэгейцев, эвенков и одного нивха также являются метисами. Коряки максимально близки к чукчам, далее к эвенкам Якутии и значительно удалены от более южных дальневосточных нивхов и удэгейцев. Показано, что коряки, чукчи и нивхи гораздо меньше различаются внутри выборок по индивидуальному геному по сравнению с эвенками, якутами и бурятами и другими сибирскими народами. Это хорошо согласуется с их территориальной удаленностью, относительно небольшой численностью и объясняется гомогенным составом предковых групп жителей обследованных поселков, которые представляют именно автохтонное население. Расположение образцов из всех выборок на рисунке 1 хорошо совпадает с их географической локализацией.



**Рис. 1.** Положение исследованных популяций в пространстве главных компонент по частотам аллелей 1.7 млн SNP.

При анализе данных с помощью метода t-SNE образцы разделяются на отдельные этноспецифичные группы (рис. 2). Выборки коряков и чукчей по сравнению с другими сибирскими популяциями располагаются намного ближе друг к другу и значительно удалены от остальных популяций Сибири. Этнически и территориально близкие друг другу популяции располагаются довольно близко, но каждый образец входит в отдельный этнический кластер. Результаты анализа генетической взаимосвязи населения Дальнего Востока свидетельствуют о значительном вкладе в картину генетических различий между популяциями коряков, чукчей, нивхов и удэгейцев географического фактора и о меньшей роли миграций и межэтнических браков в детерминации их генетических особенностей.

#### Компонентный состав генофонда популяций

Алгоритм анализа состава генофонда, реализованный в программе Admixture, позволяет разделять частоты SNP на генетические компоненты разного происхождения на уровне популяционных выборок и отдельных образцов. Обработка данных с помощью этого подхода дает возможность разделять популяции с максимальным уровнем точности, в зависимости от количества заданных компонент и числа анализируемых выборок. При задании предковых компонент  $K = 10$  на общем массиве сибирских и восточно-европейских популяций у коряков и чукчей выявляется специфичный для них генетический компонент (табл. 1), который можно интерпретировать как “северо-восточно-сибирский” генетический пласт в генофонде современных популяций. Его максимальное значение обнаружено у чукчей (99%) и коряков (93%). Третье место этот компонент занимает у нивхов (16%), далее у удэгейцев (6%), эвенков Забайкалья (6%), и Якутии (3%), а также кетов (3%). Во всех остальных исследованных популяциях он отсутствует. При  $K = 12$  коряки и чукчи разделяются между собой с доминированием собственного “коряцкого” (91%) и “чукотского” (90%) компонентов и присутствием “коряцкого” у чукчей (9%) и “чукотского” у коряков (3%). Эти результаты совпадают с данными антропологии, лингвистики и этнологии коряков и чукчей. Все остальные генетические компоненты у коряков и чукчей без метисации с пришлым населением полностью отсутствуют. Распределение этноспецифичных компонент между генетически близкими коряками и чукчами свидетельствует об их достаточно давнем по времени разделении и относительно небольшой доле межнациональных браков друг с другом.

Близость этих этносов связана с наличием генетического субстрата палеоазиатов-аборигенов,

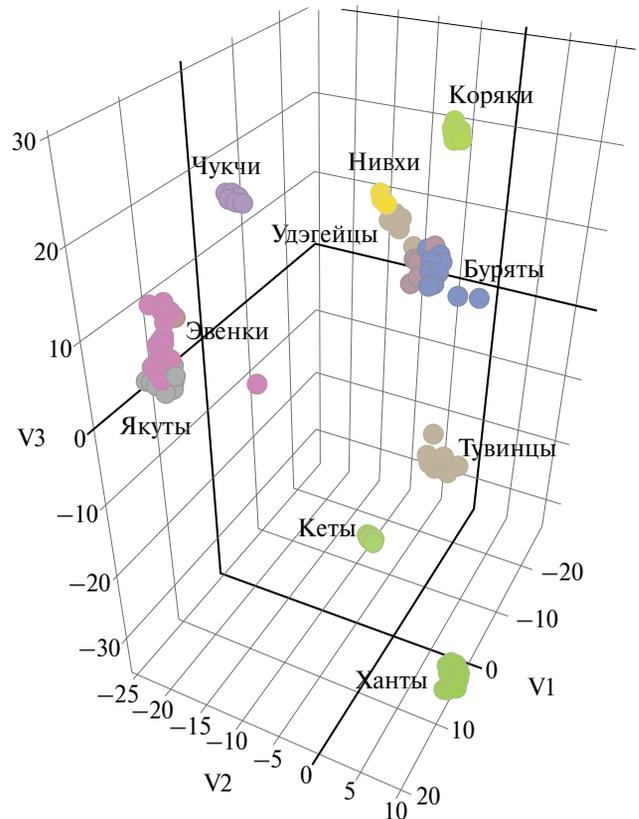


Рис. 2. Дифференциация геномов населения Дальнего Востока и Сибири по трем компонентам t-SNE.

Таблица 1. Доля северо-восточно-сибирского компонента в популяциях

Популяция	Доля северо-восточно-сибирского компонента
Чукчи	0.99082
Коряки	0.93662
Нивхи	0.16445
Удэгейцы	0.05754
Эвенки Забайкалья	0.05701
Эвенки Якутии	0.02832
Кеты	0.03185

сформировавшегося задолго до того, как входящие в него этносы приобрели присущие им лингвистические различия. Следы этой общности, несмотря на дальнейшие различия в истории популяций и контакты с населением сопредельных территорий, отчетливо выявляются в их современном генофонде. Одним из факторов, влияющих на генетическую дифференциацию сибирских популяций, является периодическое изменение

субпопуляционной структуры за счет того, что на протяжении длительного времени коренные этносы характеризовались высокой подвижностью в расселении [30]. Структура миграций в Сибири и на Дальнем Востоке довольно подробно исследована [31]. В результате проведенных работ была установлена обратная зависимость между эффективным размером популяции и скоростью этнических миграций у якутов, бурят, юкагиров, эвенов, эвенков, чукчей, коряков, нивхов, удэгейцев, тофаларов, ульчей, нанайцев и эскимосов.

#### *Идентичные по происхождению блоки сцепления*

Для более подробного анализа родства дальневосточных популяций и выяснения миграций и обмена генами, были определены и проанализированы фрагменты ДНК, которые унаследованы без рекомбинации парами сравниваемых образцов от их недавнего общего предка – блоки идентичные по происхождению (IBD). В результате биоинформатической обработки данных генотипирования высокоплотных биочипов различных сибирских популяций был проведен анализ совпадения общих по происхождению фрагментов ДНК между популяциями и отдельными индивидами. Длина сегмента IBD зависит от количества поколений от последнего общего предка [32]. При анализе IBD между образцами внутри популяций у коряков и чукчей выявлено больше общих IBD по сравнению с другими этносами. Выборка коряков показала максимальное совпадение по IBD-блокам с выборкой чукчей (156.4 сантиморганов (сМ)), далее с нивхами (23.1 сМ), эвенками Якутии (17 сМ), эвенками Забайкалья (16.6 сМ), удэгейцами (14 сМ), кетами (8.6 сМ) и якутами (8 сМ). Выборка чукчей демонстрирует схожие показатели: с эвенками Якутии (13.5 сМ), эвенками Забайкалья (12.8 сМ), нивхами (11.9 сМ), кетами (8.5 сМ) и удэгейцами (8 сМ). У чукчей и коряков наибольший вклад вносят короткие IBD-фрагменты (55% и 57%) по сравнению с длинными, что может свидетельствовать о бутылочном горлышке в прошлом во время миграций на север и северо-восток и значительной по времени изоляции от остальных популяций Сибири. Степень совпадения IBD-блоков позволяет более точно судить о генетическом родстве коряков и чукчей с другими народами, по сравнению с анализом их компонентного состава. Эти результаты хорошо совпадают с данными PCA, t-SNE и Admixture по распределению в популяциях частот аллелей и общих генетических компонент.

#### *Коэффициент геномного инбридинга*

При оценке коэффициента геномного инбридинга для длин  $ROH > 1.5$  млн пн максимальные

значения для сибирских популяций были показаны для коряков ( $F_{ROH} = 0.0446$ ) и чукчей ( $F_{ROH} = 0.0431$ ), что подтверждает высокий уровень их кровного родства [33]. Для чукчей, коряков и нивхов также наблюдается значительное увеличение суммарной длины среднего класса  $ROH$  на человека, как по сравнению с остальными популяциями, так и по сравнению с классом коротких  $ROH$  внутри популяции с увеличением дисперсии суммы  $ROH$ , что подтверждает продолжительность инбридинга и небольшую эффективную численность популяций. Большое количество и длина коротких и средних  $ROH$  указывают на достаточно древний и продолжительный инбридинг. Это является следствием генетико-демографической истории популяций, генетическое разнообразие которых складывалось под действием эффекта основателя и их изоляцией географическим расстоянием от других народов. Полученные данные показывают как демографический эффект бутылочного горлышка, так и распространенность близкородственных браков у коряков и чукчей.

#### *Гаплогруппы Y-хромосомы*

Самой частой кладой Y-хромосомы у коряков представлена C2 (59%) (табл. 2). Она является субстратным элементом коряцкого генофонда, связанным с автохтонными группами населения Приохотья. Из двадцати семи мужчин коряков без метисации по отцовской линии десять человек относятся к сублинии C2a1a2b (B90, Z32902, Z32912, Z32919, Z32926, Z32937 xB93, Z32958). Только один мужчина из выборки чукчей принадлежит к этой линии, при этом у нивхов к ней относятся 13 из 43 чистокровных мужчин (30%). YSTR-гаплотипы коряков и нивхов различаются на несколько повторов. В статье M. Karmin с соавт. [14] у трех образцов мужчин коряков, принадлежащих к гаплогруппе C3c2, гаплотипы почти полностью совпадают с нашими образцами из этой линии. У двух эвенков из Монголии [10] и одного из России также была обнаружена эта гаплогруппа [14].

Следующие три образца принадлежат к специфичной для коряков линии C2b1a2b1b (B92, M4620, Z32951, Z32957, Z32958). В других популяциях она не обнаружена. Еще два образца коряков относятся к линии C2a1a1e~ (B79, Z32849, Z32850, Z32851, Z32852). У чукчей и нивхов она отсутствует. Почти полностью совпадающий гаплотип мужчины коряка, отнесенный к гаплогруппе C3i, также был приведен в статье M. Karmin с соавт. [14]. Четыре мужчины нивха принадлежат к параллельной ей линии C2a1b (ACT1942, ACT1956, ACT1978, ACT1992, ACT1996, ACT1997) с близкими гаплотипами. Последний мужчина коряк из клады C2 относится к линии C2a1a2b1a~ (B94, Z32960, Z32963). У других этносов она не обнаружена. Медианная сеть

**Таблица 2.** Частоты встречаемости гаплогрупп Y-хромосомы в % у коряков

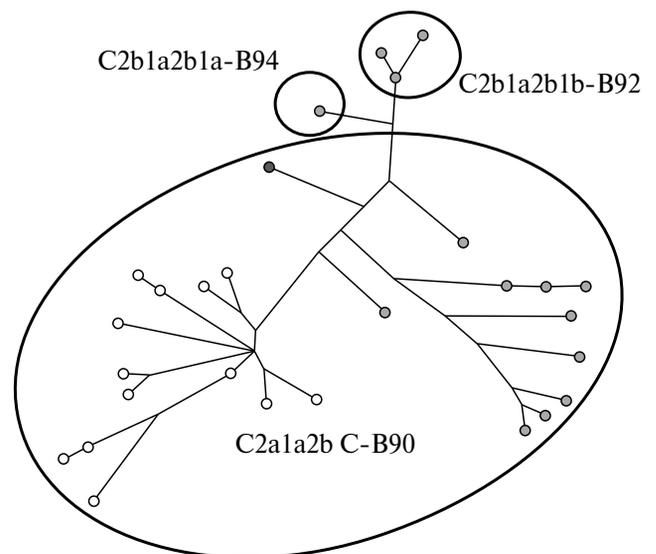
Гаплогруппы	(N = 27)
C2a1a1e~ (B79, Z32849, Z32850, Z32851, Z32852)	7.4 (2)
C2a1a2b (B90, Z32900, Z32902, Z32919, Z32920, Z32922, xB93, xZ32958)	37 (10)
C2a1a2b1a~ (B94, Z32960, Z32963)	3.7 (1)
C2b1a2b1b (B92, M4620, Z32951, Z32957, Z32958)	11.1 (3)
N1a1a1a1a (M1996, F2667 xY16325, xM2120)	7.4 (2)
N1a1a1a1a3b (Z35347, Z35349, Z35350, Z35352, Z35357, Z35358, Z35360, Y16352 xB202)	7.4 (2)
N1a1a1a1a3b1a (B203, Z35369, Z35372, Z35373, Z35374, Z35376, Z35378, Z35381 xB204, xB223, xB224)	7.4 (2)
N1a1a1a1a3b2 (B204, Z35391xB206)	3.7 (1)
Q1a1b (B143, Z36019xB284, xB280)	7.4 (2)
Q1b1a (Y575, Y693, Y703, xY705, xZ19213)	7.4 (2)

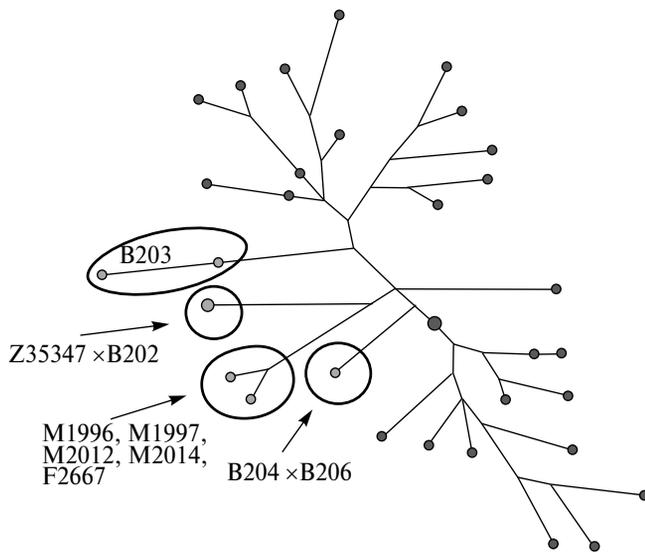
YSTR-гаплотипов гаплогруппы C2b1a2b1b у коряков и нивхов демонстрирует звездообразную филогению с недавним эффектом основателя у нивхов и более древним у коряков (рис. 3).

Присутствие этих линий у коряков, нивхов и эвенков означает наличие тесных генетических взаимосвязей между древним населением бассейна нижнего Амура и Камчатки. Это согласуется с археологическими данными о том, что в последние века до н.э. — первые века н.э. неолитические культуры на Сахалине, в северной части Охотского побережья и приморских районах Чукотки трансформировались в специализированные культуры морских зверобоев, что способствовало возникновению оседлости [34]. Данные по специфичной и частой для коряков и нивхов линии C2a1a2b дополняют информацию об их более древней генетической общности, по сравнению с результатами обработки данных аутосомных SNP. Близость коряков с нивхами по гаплотипам гаплогруппы C2a1a2b демонстрирует общую для них предковую группу, населявшую территории возле Охотского моря. В прошлом нивхи занимали более обширную территорию, чем сейчас. Ареал их расселения на материке простирался от Амура до бассейна Уды, где они граничили с коряками, что хорошо согласуется с полученными нами результатами.

Семь образцов коряков принадлежат к Y-хромосомной гаплогруппе N1a1a1a1a, разделенной на четыре ветви. Два образца относятся к очень редкой линии N1a1a1a1a~ (M1996, M1997, M2012, M2014, F2667), которая является близкой к этноспецифичным сублиниям у якутов и эвенков. Образцы, относящиеся к этой достаточно

древней гаплогруппе, обнаружены нами у четырех телеутов, четырех эвенков и двух юкагириков из Якутии. Их гаплотипы достаточно сильно отличаются от корякских, что свидетельствует об очень древнем разделении их предков. Больше всего отличий обнаружено у телеутов. У двух других мужчин коряков идентифицирована Y-хромосомная сублиния N1a1a1a1a3b~ (Z35347, Z35349, Z35350, Z35352, Z35357, Z35358, Z35360, Y16352 xB202), являющаяся специфичной для этой выборки. Она близка к доминирующей у чукчей сублинии N1a1a1a1a3b~

**Рис. 3.** Медианная сеть YSTR-гаплотипов гаплогруппы C2a1a2b. Серым обозначены коряки, белым — нивхи, черным — чукчи.



**Рис. 4.** Медианная сеть YSTR-гаплотипов гаплогруппы N1a1a1a1a. Серым обозначены коряки, черным – чукчи.

(B202). Еще два коряка имеют параллельную ей сублинию N1a1a1a1a3b1a (B203, Z35369, Z35372, Z35373, Z35374, Z35376, Z35378, Z35381 xB204, xB223, xB224), также являющуюся специфичной для коряков и близкой к родственной линии у чукчей. Последний образец коряков относится к варианту N1a1a1a1a3b2 (B204, Z35391 xB206), который ранее был обнаружен у коряков, чукчей и эскимосов [14]. Гаплотипы коряков и чукчей достаточно сильно различаются, при этом показывая общего предка для наиболее частых сублиний этой гаплогруппы (рис. 4).

Полученные результаты по филогении различных сублиний N1a1a1a1a сближают коряков с чукчами, юагирами, эвенками, эвенками и более удаленно с телеутами. Филогенетический анализ структуры гаплотипов показывает, что палеоазиатские популяции характеризуются уникальным сочетанием аллелей, нехарактерным для южно-сибирских и восточно-сибирских этносов, что также подтверждает их длительную изоляцию от миграционных потоков. Сходство состава гаплогруппы N1a1a1a1a у чукчей и коряков обусловлено формированием их генофондов на базе общих генетических составляющих. Появление этих линий в генофонде популяций северо-востока Азии, вероятно, связано с продвижением неолитических охотников из Восточной Сибири в восточном направлении. Обнаруженный специфичный вариант N1a1a1a1a~ у палеоазиатов очень рано отделился от исходного ареала на территории Южной Сибири. Дальнейшие исследования, вероятно, позволят обнаружить информативные SNP-маркеры,

которые дадут возможность более эффективно дифференцировать различные сублинии внутри гаплогруппы N1a1a1a1a более точно реконструировать древние миграционные процессы на территории Сибири.

Расселение носителей N1a1a1a1a на северо-восток привело к появлению нового генетического пласта в генофондах коренных обитателей Приохотья. Гипотеза значительного влияния на формирование северо-восточных палеоазиатов внутриконтинентальных культур (ымыяхтахской и усть-мильской) находит, таким образом, и генетическое подтверждение. Археологические данные фиксируют, что на формирование древнекорякской общности существенное влияние оказали континентальные культуры Якутии и Прибайкалья, а также Приморья и Приамурья [6].

Таким образом, генетическую основу Y-хромосомного генофонда северо-восточных палеоазиатов составляют гаплогруппы N1a1a1a1a и C2. Эти линии маркируют расселение неолитических охотников, проникших из континентальных районов (N1a1a1a1a), и более древнее коренное население приохотского региона (C2), связанное с миграциями из более южных районов Восточной Азии.

К гаплогруппе Q1b1a (Y575, Y693, Y703 xY705, xZ19213) относятся два образца из выборки коряков и шесть мужчин чукчей. Их гаплотипы практически не различаются, что подтверждает недавние межэтнические браки между ними. Еще два коряка принадлежат к сублинии Q1a1b (B143, Z36019 xB284, xB280), которая также присутствует и у чукчей с большей частотой. Эта линия является наиболее частой в популяциях эскимосов. Такой градиент частот этих гаплогрупп соответствует версии их появления у палеоазиатов в результате контактов с эскимосами и их межэтнических браков.

Ранее при изучении мтДНК коренных жителей Дальнего Востока – чукчей и коряков – было сделано заключение о том, что область формирования этой группы лежала южнее современной территории ее расселения, откуда ее представители распространялись на север, ассимилируя эскимосское население [35]. При этом генофонды чукчей, эскимосов, коряков, ительменов и алеутов включают достаточно ограниченный набор линий мтДНК восточноевразийского происхождения – A, C, D, G, Z и Y [36–39]. Особенностью генофондов чукчей и эскимосов является присутствие только трех гаплогрупп – A, C и D, распространенных и в популяциях Америки. У коряков и эвенков с высокими частотами встречается подгруппа G1. Специфической особенностью генофондов популяций Дальнего Востока является присутствие линий мтДНК гаплогруппы Y, преобладающей у ульчей (38%) и нивхов Сахалина (66%). У ороков зафиксировано влияние эффекта основателя и

генетического дрейфа [40]. Эти результаты совпадают с данными по Y-хромосомным сублиниям и аутосомным IBD-блокам.

Данные по линиям Y-хромосомы у коряков, чукчей и других популяций Дальнего Востока и Восточной Сибири хорошо согласуются с итогами анализа частот аутосомных SNP методами PCA, Admixture и IBD. Полученные результаты не противоречат общепринятым версиям этногенеза палеоазиатских народов и позволяют более точно описать структуру их генофонда и генетико-демографические процессы в популяциях. Основой формирования генофонда коряков был местный палеоазиатский компонент, который сформировался в неолите из двух предковых групп, переселившихся из Восточной Сибири и Приамурья, после чего на протяжении большого числа поколений их численность была относительно невелика, что показано очень высоким коэффициентом геномного инбридинга внутри популяции коряков и чукчей. За последние столетия видимо происходило небольшое смешение с чукчами, эскимосами и юкагирами. Новая информация о структуре генофонда коряков является важным дополнением к существующим генетическим антропологическим, археологическим, этнологическим и лингвистическим данным о их формировании и родственных связях с другими народами.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-64-00060, <https://rscf.ru/project/22-64-00060/>.

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (Регистрационный номер 223, протокол номер 15 от 28.02.2023).

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

- Итоги Всероссийской переписи населения 2020 года <https://rosstat.gov.ru/vpn/2020>
- Пестряков А.П. Арктическая раса // Большая рос. энциклопедия. <https://old.bigenc.ru/ethnology/text/1828884>
- Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Богунова А.А. и др. Демографический портрет коряков севера Камчатки // Вестник МГУ. Серия 23. Антропология. 2020. № 4. С. 111–122. <https://doi.org/10.32521/2074-8132.2020.4.111-122>
- Левин М.Г. Этническая антропология и проблемы этногенеза народов Дальнего Востока. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 359 с.
- Вдовин И.С. Очерки этнической истории коряков. Л.: Наука, 1973. 304 с.
- Васильевский Р.С. Происхождение и древняя культура коряков. Новосибирск: Наука. СО, 1971. 251 с.
- Батянова Е.П. Народы Северо-Востока Сибири // Серия Народы и культуры. М: Наука, 2010. 806 с.
- Народы России / Под ред. Тишков В.А. М.: Большая рос. энциклопедия, 1994. 479 с.
- Grugni V., Raveane A., Ongaro L. et al. Analysis of the human Y-chromosome haplogroup Q characterizes ancient population movements in Eurasia and the Americas // BMC Biology. 2019. № 3. doi:10.1186/s12915-018-0622-4
- Liu B.L., Ma P.C., Wang C.Z. et al. Paternal origin of Tungusics – peaking populations: Insights from the updated phylogenetic tree of Y – chromosome haplogroup C2a – M86 // American Journal of Human Biology. 2021. V. 33. №. 2. С. e23462. doi:10.1002/ajhb.23462
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in Northern Asia // PLoS One. 2010. №5(12), e15214. doi:10.1371/journal.pone.0015214
- Pagani L., Lawson D.J., Jagoda E. et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia // Nature. 2016. № 538. P. 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature19792>
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S. et al. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo // Nature. 2010. № 463. P. 757–762. <https://doi.org/10.1038/nature08835>
- Karmin M., Saag L., Vicente M. et al. A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture // Genome Res. 2015. № 25. P. 459–466. <https://doi.org/10.1101/gr.186684.114>
- Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G. et al. Ancient links between Siberians and native Americans revealed by subtyping the Y chromosome haplogroup Q1a // Journal of Human Genetics. 2011. № 56. P. 583–588. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.64>
- Малыарчук Б.А. Генетические маркеры о распространении древних морских охотников в Приохотье // Вавиловский журн. генетики и

- селекции. 2020. № 24 (5). С. 539–544.  
<https://doi.org/10.18699/VJ20.646>
17. *Dryomov S.V., Nazhmidenova A.M., Shalaurova S.A. et al.* Mitochondrial genome diversity at the Bering Strait area highlights prehistoric human migrations from Siberia to northern North America // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. №10. P. 1399–1404.  
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.286>
  18. *Tamm E., Kivisild T., Reidla M. et al.* Beringian standstill and spread of Native American founders // *PLoS One.* 2007.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000829>
  19. *Guo Y., He J., Zhao S. et al.* Illumina human exome genotyping array clustering and quality control // *Nat. Protocols.* 2014. V. 9 P. 2643–2662.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.174>
  20. Illumina.GenomeStudio  
[https://emea.support.illumina.com/array/array\\_software/genomestudio/downloads.html](https://emea.support.illumina.com/array/array_software/genomestudio/downloads.html)
  21. *Browning B.L., Browning S.R.* Improving the accuracy and efficiency of identity-by-descent detection in population data // *Genetics.* 2013. V. 194. № 2. P. 459–471.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.113.150029>
  22. *Browning S.R., Browning B.L.* Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 5. P. 1084–1097.  
<https://doi.org/10.1086/521987>
  23. *Patterson N., Price A.L., Reich D.* Population structure and eigenanalysis // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. № 12. P. 2074–2093.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020190>
  24. *Menozi P., Piazza A., Cavalli-Sforza L.* Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans // *Science.* 1978. V. 201. № 4358. P. 786–792.  
<https://doi.org/10.1126/science.356262>
  25. *Skotte L., Korneliussen T., Albrechtsen A.* Estimating individual admixture proportions from next generation sequencing data // *Genetics.* 2013. V. 195(3). P. 693–702.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.113.154138>
  26. *Alexander D.H., Novembre J., Lange K.* Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals // *Genome Res.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009. V. 19. № 9. P. 1655–1664.  
<https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>
  27. *Alexander D.H., Lange K.* Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation // *BMC Bioinformatics.* 2011. V. 12. P. 212–246.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-246>
  28. International Society of Genetic Genealogy.  
<http://www.isogg.org/>
  29. *Bandelt H.J., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.  
[https://doi.org/10.1093/molbev.a026036](https://doi.org/10.1093/molbev/a026036)
  30. *Гольцова Т.В., Осипова Л.П.* Генетико-демографическая структура популяций коренных народов Сибири в связи с проблемами микроэволюции // *Информ. вестник ВОГиС.* 2006. Т. 10. № 1. С. 126–154.
  31. *Евсюков А.Н., Жукова О.В., Рычков Ю.Г., Шереметьева В.А.* География генетических процессов в народонаселении: генные миграции в Сибири и на Дальнем Востоке // *Генетика.* 2000. Т. 36. № 2. С. 271–282.
  32. *Колесников Н.А., Харьков В.Н., Зарубин А.А. 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>
  33. *Gusev A., Kenny E., Salit J. et al.* DASH: A method for identical-by-descent haplotype mapping uncovers association with recent variation // *Am. J. of Human Genet.* 2011. V. 88. P. 706–717.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.023>
  34. *Гурвич И.С.* Этногенез народов Севера. М.: Наука, 1980. 277 с.
  35. *Дамба Л.Д., Губина М.А., Кончук Ч.Д. и др.* Особенности представленности монголоидных и европеоидных гаплогрупп митохондриальной ДНК в двух популяциях коренных жителей юга Сибири // *Генофонд населения Сибири. Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН,* 2003. С. 19–24.
  36. *Воевода М.И., Авксентюк А.В., Иванова А.В. и др.* Молекулярно-генетические исследования в популяции коренных жителей Чукотки. Анализ полиморфизма митохондриальной ДНК и генов алкоголь-метаболизирующих ферментов // *Сиб. экол. журнал.* 1994. Т. 1. №. 2. С. 149–162.
  37. *Сукерник Р.И., Шур Т.Г., Стариковская Е.Б., Уоллес Д.К.* Изменчивость мтДНК у коренных жителей Сибири в связи с реконструкцией эволюционной истории американских индейцев // *Генетика.* 1996. Т. 32. №. 3. С. 432–439.
  38. *Starikovskaya Y.B., Sukernik R.I., Schurr T.G. et al.* mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the genetic history of Ancient Beringia and the peopling of the New World // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 63. №. 5. P. 1473–1491.  
<https://doi.org/10.1086/302087>
  39. *Деренко М.В., Малярчук Б.А.* Генетическая история коренного населения Северной Азии // *Природа.* 2002. Т. 10. С. 69–76.
  40. *Бермишева М.А., Кутуев И.А., Спицын В.А. и др.* Анализ изменчивости митохондриальной ДНК в популяции ороков // *Генетика.* 2005. Т. 41. № 1. С. 78–84.

## Paleoasian Substrate in the Gene Pool of Koryaks According to Data on Autosomal SNP Polymorphism and Y-Chromosome Haplogroups

V. N. Kharkov<sup>1, \*</sup>, N. A. Kolesnikov<sup>1</sup>, A. A. Zarubin<sup>1</sup>, L. V. Valikhova<sup>1</sup>, I. Yu. Khitrinskaya<sup>1</sup>, M. I. Voevoda<sup>2</sup>, M.A. Gubina<sup>3</sup>, A. L. Sukhomyasova<sup>4</sup>, V. A. Stepanov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Federal State Budget Scientific Institution "Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine", Novosibirsk, 630060 Russia*

<sup>3</sup>*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>4</sup>*Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677000 Russia*

\*e-mail: vladimir-kharkov@medgenetics.ru

The gene pool of the Koryaks was studied in comparison with other Far Eastern and Siberian peoples using a genome-wide panel of autosomal single-nucleotide polymorphic markers and Y-chromosome markers. The results of analyzing the frequencies of autosomal SNPs using various methods, the similarity in the composition of Y-chromosome haplogroups and YSTR haplotypes indicate that the gene pool of the Koryaks is as close as possible to the Chukchi one and was formed as a result of the unification of several groups whose ancestors moved from the territory of modern Yakutia and the Amur region. The two dominant Y-chromosome haplogroups of the Koryaks with different sublineages and haplotype clusters demonstrate their contacts with the Chukchi, Evens, Yukaghirs and Eskimos. Analysis of the composition of genetic components and IBD blocks on autosomes indicates the maximum genetic proximity of the Koryaks to the Chukchi. Among the Siberian populations, the Chukchi, Koryaks and Nivkhs form a separate cluster from the main group of Siberian populations, while the Chukchi and Koryaks are more closely related. Far Eastern populations are divided in full accordance with geographic localization into the northern group (Chukchi and Koryaks) and the southern group, including the Nivkhs and Udege. A more detailed analysis of the component composition of gene pools in some populations reveals components specific to them. The isolation of such components is associated with founder effects and a shift in allele frequencies for these populations. The Koryaks and Chukchi are one of the most striking examples of long-standing genetic kinship. In their populations, maximum values of the level of genomic inbreeding  $F_{ROH} > 1.5$  (0.0422, 0.0409) were found, which is natural due to their relative isolation.

**Keywords:** gene pool, population, genetic diversity, genetic components, Y chromosome, Koryaks.

УДК 575.22;572.08

## ГЕНЕТИКО-АНТРОПОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОГРЕБЕНИЯ 93 ТОЛЬЁНСКОГО МОГИЛЬНИКА. УДМУРТИЯ, ПОЛОМСКАЯ АРХЕОЛОГИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА

© 2024 г. Е. В. Веселовская<sup>1, 2, \*</sup>, Ю. В. Рашковская<sup>2</sup>, А. С. Демин<sup>3</sup>,  
Х. Х. Мустафин<sup>4, \*\*</sup>, И. Э. Альборова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Российский государственный гуманитарный университет, Москва, 125993 Россия

<sup>2</sup>Институт этнологии и антропологии Российской академии наук

им. Н.Н. Миклухо-Маклая, Москва, 119334 Россия

<sup>3</sup>Историко-культурный музей-заповедник «Иднакар» им. М.Г. Ивановой, Глазов, 427622 Россия

<sup>4</sup>Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),

Московская область, Долгопрудный, 141700 Россия

\*e-mail: veselovskaya.e.v@yandex.ru

\*\*e-mail: kh-mstf@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 21.01.2024 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

Проблемы взаимоотношения культур Волго-Камского региона в целом и формирования удмуртского этноса в частности, решаемые в исторической перспективе, занимают не последнее место в трудах ученых различной специализации. Настоящим исследованием была поставлена задача комплексной характеристики захоронения представителя полумской археологической культуры из Тольёнского могильника, расположенного на территории Дебёского р-на Удмуртии, на правом берегу р. Чепцы. Раскопки осуществлялись В.А. Семеновым в 80-х гг. прошлого века. Археологический и неполный антропологический материал хранится в Историко-культурном музее-заповеднике «Иднакар» им. М.Г. Ивановой Удмуртской Республики. Получена абсолютная радиоуглеродная датировка образца –  $1440 \pm 69$  лет. Антропологическое изучение останков выявило предположительный тип телосложения, грудной или грудно-мускульный, прижизненная длина тела составляла 166 см. Изученный индивид отличался брахикефалией, большими широтными размерами несколько уплощенного лица, выступающим носом. Проведено научное восстановление внешности методом М.М. Герасимова, представлены контурные и графические портреты. Впервые в лаборатории, реализующей новые подходы к ее устройству и организации, проведены палеогенетические исследования представителя полумской археологической культуры. С высокой надежностью установлены Y-хромосомная гаплогруппа **N1a1a1a2b (B181)** и гаплогруппа **U4** мтДНК. Выявленные гаплогруппы у индивида № 93 из Тольёнского могильника по мужской и женской линиям характерны для центральной части Волго-Уральского региона, что согласуется с результатами антропологических и археологических исследований. У данного индивида с высокой вероятностью предсказаны голубой цвет радужной оболочки глаз, светлый цвет волос и промежуточный цвет кожи.

*Ключевые слова:* полумская археологическая культура, Тольёнский могильник, краниология, остеология, антропологическая реконструкция внешности по черепу, древняя ДНК, Y-хромосома, мтДНК, NGS, YSNP, гаплогруппа, YSTR-гаплотип, митотип.

DOI: 10.31857/S0016675824060096 EDN: BXRDR1

Интерес к истории формирования удмуртского этноса находится в фокусе внимания ученых различных направлений. Однако сочетание генетического анализа с реконструкцией внешности по черепу древнего населения Удмуртии крайне редки. В настоящем исследовании проведены

комплексное антропологическое и генетическое исследования на материалах одного конкретного погребения, что является уникальной практикой для данного региона. Инициирована эта работа была созданием на базе историко-культурного музея-заповедника «Иднакар» им. М.Г. Ивановой (г.

Глазов, Республика Удмуртия) виртуального музея погребального обряда финно-пермского населения. В силу ряда причин для комплексного анализа было выбрано мужское погребение № 93 Тольёнского могильника, относящегося к памятникам полемской археологической культуры. Костяк был передан в музей-заповедник вместе с антропологической коллекцией из разновременных погребальных комплексов в 2020 г. из Удмуртского института истории, языка и литературы УдмФИЦ и находится сегодня на постоянном хранении в фондах музея<sup>1</sup>.

Впервые правила по работе с древней ДНК были изложены в работах в 1986–1987 гг. (О. Handt с соавт., М. Krings с соавт.), они успешно применяются и по сей день. Ряд ведущих российских лабораторий (под руководством проф. Е.И. Робаева, проф. Е.Б. Прохорчука, А.С. Пилипенко, И.В. Корниенко) так же, как и зарубежные коллеги используют данные стандартные подходы. Оснащение такого рода лабораторий по древней ДНК требует немалых капитальных вложений и финансовых затрат на их поддержание. В настоящей работе впервые применен инновационный подход, разработанный в лаборатории исторической генетики МФТИ в Москве.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Неполный посткраниальный скелет и череп из разрозненных костей были доставлены в Центр физической антропологии (ЦФА) Института этнологии и антропологии РАН из “Историко-культурного музея-заповедника Удмуртской республики “Иднакар” им. М.Г. Ивановой. Сохранность можно охарактеризовать как среднюю. Череп был реставрирован. Определение пола по черепу проводили по стандартным методикам В.П. Алексева, Г.Ф. Дебеца [1]. Определение пола по скелету осуществлялось на основе формы большой седалищной вырезки тазовой кости, обращали внимание также на такие визуальные признаки как массивность скелета и развитие костного рельефа [2].

Датирование радиоуглеродным методом и количественный состав изотопов азота и углерода проводили в лаборатории археологической технологии Института истории материальной культуры (ИИМК) РАН. Анализ изотопного состава выполнен на масс-спектрометре ThermoFinnigan Delta V с элементным анализатором CE/EA-1112.

Восстановление прижизненной внешности на основе черепа № 93 из Тольёнского могильника проведено методом М.М. Герасимова [3]. В лаборатории антропологической реконструкции ЦФА ИЭА РАН после многолетних исследований создана и апробирована программа “Алгоритм

внешности”, обобщающая опыт российской школы антропологической реконструкции и включающая основные достижения зарубежных специалистов [4]. Современные реконструкции, выполненные с применением этой программы, отличаются большой достоверностью и точной передачей деталей, индивидуализирующих внешность.

### *Описание инновационного подхода в организации устройства лаборатории для исследований древней ДНК*

Впервые правила по работе с древней ДНК были изложены в работах [5–9]. Ряд ведущих российских лабораторий (под руководством проф. Робаева Е.И. [10], проф. Прохорчука Е.Б. [11], Пилипенко А.С. [12], Корниенко И.В.) используют данные стандартные подходы.

В лаборатории исторической генетики МФТИ для работы с археологической ДНК человека впервые применен инновационный подход, при котором все работы с древней ДНК проводились в системе компактных изоляторов в виде перчаточных боксов, соединенных друг с другом передаточными камерами и все вместе размещенных в ламинарном укрытии. Важнейшую роль в обеспечении чистых условий в системе сыграло замещение в нем атмосферного воздуха азотом особой чистоты. При таком подходе удается обеспечить высочайшую степень защиты от контаминации ДНК человека без применения систем изолированных чистых комнат.

Все работы по пробоподготовке образцов и разделению ДНК проводились в лаборатории, оснащенной независимой системой вентиляции, которая обеспечивает предварительную очистку атмосферного воздуха и создает избыточное давление в помещении. При входе в лабораторию организован барьер для перехода из “грязной” в “серую” зону. В центре лаборатории установлено ламинарное укрытие с вентиляционными блоками, оснащенными фильтрами грубой и тонкой очистки воздуха и блоками УФ-облучения. Ламинарное укрытие формирует “чистую” зону. В “чистой” зоне установлена система перчаточных боксов, соединенных между собой передаточными камерами. Перчаточные боксы обеспечивают физическое отделение рабочей зоны от окружающей среды, а передаточные камеры – перемещение образцов, расходных материалов и инструментов. Небольшие внутренние объемы перчаточных боксов и небольшая площадь поверхностей облегчают очистку боксов и размещенного в них оборудования. Установленный в каждом боксе источник УФ позволяет достигать высоких экспозиций облучения и, соответственно, эффективной инактивации посторонней ДНК. Прозрачность толстостенного акрила, из которого изготовлены перчаточные боксы и

передаточные камеры, обеспечивает хорошие освещенность и обзор рабочего пространства.

Перчаточные боксы и передаточные камеры заполнены азотом особой чистоты. Принципиальным при таком подходе является то, что в азоте из-за специфики его получения из атмосферного воздуха абсолютно отсутствуют частицы органического происхождения (в частности фрагменты человеческой ДНК), что недостижимо при использовании самых современных воздушных фильтров.

Для получения азота особой чистоты использован газогенератор PEAK Scientific NG-5000A. Газогенератор имеет сравнительно невысокую производительность (до 5 л в мин), однако при использовании двух 270-ти литровых ресиверов, наполняемых до 8 атмосфер, накапливается объем чистого азота, необходимый для работы в боксах. Принцип действия этого прибора основан на технологии короткоциклового безнагревательной адсорбции (PSA – Pressure Swing Adsorption) для разделения молекул азота и кислорода углеродными молекулярными ситами (CMS – Carbon Molecular Sieve). Атмосферный воздух подается в газогенератор PEAK Scientific NG-5000A под давлением и проходит три системы фильтров: фильтр предварительной очистки (от частиц размером более 1 микрона), фильтр тонкой очистки (от частиц размером более 0.1 микрона) и угольный фильтр (Carbon filter) для молекулярной очистки от вирусов, летучих органических соединений, паров, мельчайших твердых частиц воздуха. Далее очищенный воздух поступает в колонны, наполненные гранулами с порами 3 ангстрема (углеродные молекулярные сита). При прохождении через колонны создается чистый азот, которым наполняются накопительные ресиверы. Один цикл генерации азота длится несколько минут, по истечении которых осуществляется процедура регенерации гранул в колоннах. При регенерации все остатки загрязнений от предыдущего цикла выбрасываются потоком кислорода в атмосферу, что обеспечивает практически неограниченный ресурс колонн с молекулярными ситами.

Для откачки атмосферного воздуха из передаточных камер использован высокопроизводительный вакуумный насос ULVAC GLD-051. Подача особо чистого азота в перчаточные боксы и передаточные камеры, а также эвакуация из них газа осуществляется через независимые системы газопроводов.

Каждый бокс предназначен для определенного этапа работы с древними образцами. Первый – для механической очистки образцов, второй – для ультразвуковой “обдирки”, третий – для измельчения образцов до состояния костной муки, четвертый – для выделения ДНК, пятый – для “мокрых работ”. Внутри каждого бокса размещено необходимое

оборудование и дополнительные УФ-лампы. Работы в одном боксе должны осуществляться только с одним археологическим образцом, после чего бокс и его содержимое должны тщательно обрабатываться гипохлоритом натрия, промываться водой, облучаться ультрафиолетом и заполниться чистым азотом. Таким образом в боксах достигается высокая степень чистоты от следов ДНК от предыдущих экспериментов и ДНК из внешней атмосферы.

Все работы по приготовлению NGS-библиотек (Next-Generation Sequencing) проводятся на другом этаже здания в изолированном от современной ДНК лабораторном помещении так же в специальных перчаточных боксах с газовой средой из азота высокой чистоты.

#### *Пробоподготовка и выделение ДНК из археологических образцов*

Стоматологическим прецизионным оборудованием Implantmed SI-923 с фрезой из твердосплавного металла очищался корень зуба от верхнего слоя загрязнений, а отрезной фрезой с корня зуба срезалась коронка. Затем для удаления более глубоких слоев загрязнения зубов проводилась кавитационная “обдирка” в ультразвуковой мойке SONIPREP 150 PLUS в ультрачистой воде со спиртом при определенных оптимизированных настройках мощности и амплитуды ультразвуковых колебаний. Далее образцы зубов выдерживались под УФ-облучением по 5 мин с каждой стороны.

Как было показано в ранее опубликованной работе [14], при измельчении дентина и богатого ДНК цемента выделяется ДНК больше по сравнению с тем, что выделяется из порошка дентина высверленного из корня зуба. Поэтому измельчению до состояния костной муки подвергался весь очищенный корень зуба. Измельчение проводилось в шаровой мельнице FRITSCHE Pulverisette 23.

ДНК выделялась из зубного порошка массой 0.2 г. в соответствии с протоколом [15]. В одном боксе выделялась ДНК только из одного археологического образца и отрицательного контрольного образца для отслеживания уровня контаминации. Во всех последующих процессах, связанных с пробоподготовкой археологической ДНК при приготовлении NGS-библиотек, также готовился и отрицательный контроль. ДНК из одного образца № 93 выделялась несколько раз из разных зубов. Совпадение результатов генотипирования ДНК, выделенной из разных зубов, т.е. их повторяемость, является прямым указанием на принадлежность зубов к одному и тому же индивиду, а также указанием на отсутствие контаминации со стороны как современной ДНК, так и древней ДНК других образцов. Количество ДНК оценивалось с использованием набора Quantifiler™ Trio (TFS, USA) согласно протоколу производителя.

*Определение Y-хромосомного гаплотипа индивида № 93 из Тольёнского могильника*

С использованием набора реактивов Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit (TFS, USA) был генотипирован образец ДНК индивида № 93. Данный набор реагентов зарекомендовал себя высокочувствительным к деградированным археологическим образцам [16–19]. Фрагментный анализ 27-ми STR-локусов Y-хромосомы осуществлялся на секвенаторе AB3500xl (TFS, USA) с разделительной матрицей POP-7 (TFS, USA) согласно инструкциям производителя. Количество циклов ПЦР амплификации было увеличено с рекомендуемых 25 до допустимых 32, что положительно сказалось на результатах. Последующая обработка данных осуществлялась в программе IDX v.1.4 GeneMapper (TFS, USA). Предполагаемая гаплогруппа определялась в онлайн программе <https://www.nevgen.org/>.

*Next-Generation*

*Sequencing (NGS) – мощный эффективный метод палеогенетических исследований*

Создание геномных библиотек осуществлялось с использованием набора реагентов KAPA HyperPrepkits (Roche, Switzerland). С помощью специально разработанной панели зондов обогащали целевые участки генома. Данная кастомная панель маркеров включает такие таргетные участки как SNP Y-хромосомы нерекombинирующей части (NRY), полную митохондриальную ДНК и SNP, связанные с предсказанием фенотипических признаков (см. Приложение). Контроль качества полученных библиотек производился на приборе Agilent Bioanalyzer 2100 с помощью набора реагентов High Sensitivity Kit (Agilent Technologies, USA) по протоколу производителя.

NGS проводилось на секвенирующей платформе MiSeq (Illumina, USA). Подготовка геномных библиотек к запуску их секвенирования осуществлялась согласно протоколам Illumina (Reagent Kit v2 300-cycles).

Первичная обработка NGS-данных, включая бейсколинг и демультимплексирование, была выполнена с использованием программного обеспечения MiSeq Control/RTA (Illumina). Сырые прочтения для каждого образца были предварительно обработаны с использованием программы PRINSEQ-lite [20] для исключения последовательностей низкого качества (среднее качество прочтения Q-score <25) и коротких фрагментов (длина чтения <50 нуклеотидов). Проведение картирования осуществлено на референсный геном человека (GRCh38) с использованием программного пакета

BWA [21]. Проведение поиска SNP и аннотирование SNP проведено с использованием программного пакета GATK [20]. При этом были отфильтрованы варианты, которые не соответствовали следующим критериям: глубина прочтения >15×, качество картирования >30. Гаплогруппы Y-хромосомной ДНК были определены с использованием баз данных ISOGG.

Гаплогруппы мтДНК были определены с помощью онлайн-программы [haplogrep.org](http://haplogrep.org), путем загрузки vcf-файлов с полной последовательностью митохондриальной ДНК.

*Археологическое описание памятника*

Тольёнский могильник расположен на южном склоне коренной террасы правого берега р. Чепцы к юго-западу от дер. Тольён в Дебёском р-не Удмуртской Республики [22]. Он впервые упоминается археологом Н.Г. Первухиным, проводившим археологические изыскания в Глазовском уезде в 80-е гг. XIX в. [23]. Дальнейшие описания памятника проводились в 1960, 1983, 1985, 1986 гг. [24, 25]. Археологическая коллекция, полученная в результате этих работ, в 2019 г. передана на постоянное хранение в ИКМЗ “Иднакар” им. М.Г. Ивановой из УИИЯЛ УрО РАН Удм ФИЦ”. Судя по вещественным артефактам (посуда, украшения, оружие и др.), исследованный участок использовался для захоронений в VIII–X вв. В.А. Семёнов [25] датировал могильник IX–началом X в. Современное состояние памятника оценено как удовлетворительное.

Погребение № 93 было исследовано в 1986 г. в ходе работ под руководством В.А. Семёнова [26]. Мужчина был похоронен на глубине 78 см в гробовище из луба. Слева от черепа были найдены втульчатый и черешковый с обломленным черешком наконечники стрел, в изголовье – втульчатый топор с умеренно расширяющимся и незначительно оттянутым назад лезвием. В области таза лежал нож со сломанным острием клинка, а у левой ступни, но за пределами гробовища, наконечник копья с двушипным пером подтреугольной формы и отверстием подзагвоздок в нижней части втулки. Предположительные датировки утвари – от VII до X вв. н.э.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Антропологическое исследование*

По признакам черепа и посткраниального скелета исследуемый индивид, несомненно, мужского пола. По совокупности остеологических параметров возраст оценивается в 35–40 лет. Благодаря проведенной реставрации черепа удалось применить краниометрическую программу в полном

<sup>3</sup>МЗИ-193, А-105

объеме. Череп пригоден для достоверной реконструкции внешнего облика.

Краниометрические параметры представлены в табл. 1, во втором столбце. По продольному диаметру (наибольшая длина) череп попадает в категорию средних значений. Поперечный диаметр (наибольшая ширина) находится на границе больших и средних размеров. Большинство других широтных размеров попадают в категорию больших: голова и лицо широкие. Также измеряли: скуловой диаметр, верхнюю и среднюю ширину лица, назомалярный и зигомаксиллярный углы, глубину клыковой ямки. Эти показатели свидетельствуют о некоторой уплощенности лица, нос большой по длине и ширине, переносье довольно высокое и среднеширокое, нос выступает значительно.

На основе размеров черепа были рассчитаны индексы. Черепной указатель индивида попадает в категорию брахикрании (широкий), что означает, что мозговая часть черепа имеет округлую форму. По поперечному фацио-церебральному указателю (отношению скулового диаметра к поперечному) череп характеризуется большим значением. Общий лицевой и верхний лицевой указатели попадают в градации малых размеров. Таким образом, индивид обладает низким и широким лицом. В целом индивид характеризуется брахикранией, большими широтными размерами как мозговой части черепа, так и лица.

#### *Исследование посткраниального скелета*

По рубрикам А.Г. Тихонова продольные и поперечные размеры плечевой кости попадают в категории малых и очень малых значений [27]. Можно отметить, что бедренная кость входит в градации больших размеров, а ее поперечные параметры – средние. По длине большеберцовая кость принимает среднее значение.

Мышечный рельеф развит незначительно. Практически все доступные для описания признаки, характеризующие рельеф, на верхних конечностях оцениваются в 1 балл по трехбалльной шкале, а на нижних конечностях – в 1–2 балла [28].

#### *Остеометрические указатели, определение типа телосложения и прижизненной длины тела (роста)*

Удалось рассчитать некоторые индексы, характеризующие пропорции скелета. Так, ключично-плечевой указатель входит в градации средних размеров, что говорит о гармоничном развитии ключицы и плечевой кости относительно друг друга. Берцово-бедренный указатель попадает в малые размеры, что свидетельствует о некоторой удлиненности бедренной кости относительно большеберцовой. Плече-бедренный указатель относится

к категории малых величин, можно констатировать удлинение нижней конечности относительно верхней.

Длина тела была определена по формуле В.В. Бунака [29]. Прижизненный рост индивида составлял порядка 166 см. Для раннего средневековья этот рост оценивается как средний для мужского населения Европейской равнины. Отмечается некоторая удлиненность нижних конечностей относительно верхних. По развитию рельефа на длинных костях можно констатировать слабую физическую нагрузку с большей вовлеченностью нижних конечностей. Тип телосложения оценивается как грудной или грудно-мускульный. Незначительное развитие рельефа на длинных костях и отсутствие возрастных изменений на позвонках позволяют выдвинуть гипотезу о посадском происхождении данного индивида.

#### *Результаты анализа радиоуглеродного датирования*

Получена абсолютная радиоуглеродная датировка образца:  $1440 \pm 69$  лет назад. Это означает, что данный индивид жил примерно в конце VI в., однако археологические артефакты указывают на более позднюю датировку – VIII в. Чтобы делать окончательные выводы о времени погребения, следует продатировать еще несколько образцов помолской археологической культуры.

#### *Исследование изотопов углерода и азота*

Полученные значения  $\delta^{13}\text{C}$  ( $-20\text{‰}$ ) и  $\delta^{15}\text{N}$  ( $10.4\text{‰}$ ) указывают на большую долю белкового компонента в рационе, с вероятным преобладанием потребления мяса травоядных млекопитающих.

#### *Восстановление внешнего облика в виде графической реконструкции и составление словесного портрета прижизненных особенностей*

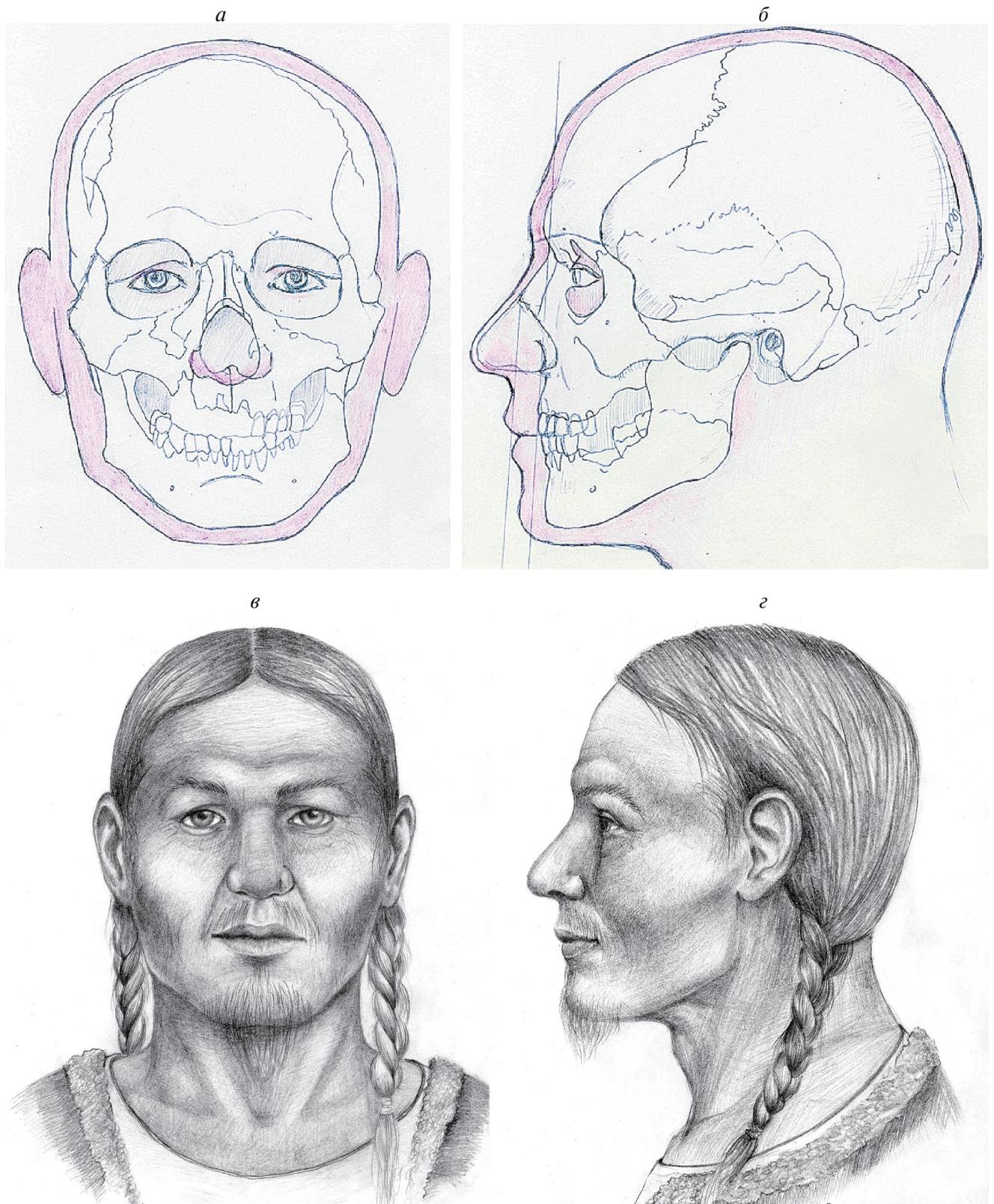
В табл. 1, во втором столбце, представлены размеры черепа индивида № 93 из Тольёнского могильника. На их основе по программе “Алгоритм внешности” рассчитывали прижизненные размеры головы, которые даны в третьем столбце. В соответствии с программой “Алгоритм внешности” для определения пропорций головы рассчитывали индексы (относительные размеры), которые позволяют охарактеризовать индивидуальные особенности внешности в виде “словесного портрета”, который представлен ниже.

Голова индивида характеризуется брахикранией (головной указатель 83), округлая при взгляде в профиль. Лицо среднеширокое, по форме в анфас прямоугольное. Вертикальная и горизонтальная профилировки лица средние. Линия лба в профиль волнистая (из-за развитого рельефа). Глазная щель

**Таблица 1.** Краниологические измерения и рассчитанные прижизненные размеры головы индивида № 93 из Тольёнского могильника

Череп / голова	Размеры (мм)	
	череп	голова
Продольный диаметр / продольный диаметр	180	194
Поперечный диаметр / поперечный диаметр	148	161
Ширина лба / ширина лба	115	130
Наименьшая ширина лба / наименьшая ширина лба	99	109
Расстояние между эктокантионами / расстояние между наружными уголками глаз	103.5	87.5
Межглазничное расстояние / расстояние между внутренними углами глаз	20	36
Скуловой диаметр / скуловой диаметр	143	153
Морфологическая высота лица (МВЛ) / МВЛ	126	133
Физиономическая высота лица* (МВЛ)	(126)	193*
Высота лба / высота лба	60	60
Верхняя ширина лица / верхняя ширина лица	111	121
Высота носа / высота носа	64	64
Симотическая ширина / ширина переносья	8	13
Ширина между носочелюстными точками / ширина спинки носа	17	22
Расстояние от подносовой точки до нижней носовой раковины / высота крыла носа	16	16
Угловая ширина нижней челюсти / угловая ширина нижней челюсти	112	132
Высота верхней челюсти от подносовой точки до супрадентальной / высота верхней губы	13	13
Высота подбородка / высота подбородка	21	28
Высота нижней челюсти / высота нижней челюсти	41	48
Высота нижней части лица/высота нижней части лица	62	69
Высота уха* (скуловой диаметр)	(143)	65.4*
Ширина уха* (высота уха)	(65.5)	38.5*
Ширина носа* (расстояние между альвеолярными возвышениями клыков)	(37)	36.5*
Ширина между носогубными складками* (расстояние между альвеолярными возвышениями клыков)	(37)	53*
Ширина рта* (ширина зубной дуги на уровне вторых премоляров)	(53)	56*
Высота глазной щели* (высота орбиты)	(35)	10*
Длина глазной щели* (ширина орбиты)	(44)	26.4*

Примечание. \* – размер, рассчитанный по уравнению регрессии на основе размера черепа, указанного в скобках. Остальные размеры рассчитаны путем прибавления толщины мягких тканей.



**Рис. 1.** Реконструкция облика по черепу индивида № 93 из Тольёнского могильника. Авторы Е.В. Веселовская, О.Э. Валева. *а* – контурная реконструкция, фас; *б* – контурная реконструкция, профиль; *в* – графический портрет, фас; *г* – графический портрет, профиль.

короткая и невысокая, глазное яблоко выступает в средней степени. Складка верхнего века развита сильно, особенно в латеральной части. Скулы заметно выступают. Ширина носа в крыльях средняя. переносье узкое и среднее по глубине. В профиль спинка носа прямая, по высоте нос средний, основание носа горизонтальное. Верхняя губа низкая, ротовая щель по ширине узкая. Прикус щипцеобразный, губы выступают слабо, равномерно относительно друг друга. Подбородок средний по ширине и высоте, выступает вперед слабо, по форме квадратный. На рис. 1 представлены контурные и графические реконструкции прижизненного облика.

#### Результаты генетического исследования

Из предоставленного образца в виде двух зубов от индивида № 93 из Тольевского могильника выделена ДНК. С использованием набора реагентов Quantifiler™ Trio (TFS, USA) получены достаточное количество и удовлетворительное качество выделенной ДНК (табл. 2). ДНК образца была выделена с относительно высокой концентрацией. Наличие Y-хромосомных фрагментов в ДНК индивида № 93 указывает на его принадлежность к мужскому полу. Степень деградации ДНК оказалась невысокой (количества коротких фрагментов ДНК превалировало над количеством длинных фрагментов незначительно). Это указывает на хорошую сохранность исследуемой ДНК.

#### Анализ аутентичности древней ДНК

Древняя ДНК помимо фрагментации характеризуется наличием в ее последовательности химических модификаций. Самая типичная нуклеотидная модификация в древней ДНК — это дезаминирование цитозина до урацила. Во время ПЦР ДНК-полимераза заменяет в реплицируемой цепи ДНК урациловые основания на тиминовые (замены С→Т), что в свою очередь приводит к вставке в комплементарную цепь ДНК адениновых оснований (замены G→A). В результате в последовательности ДНК образуются характерные для древней ДНК модификации замены С→Т и G→A [30, 15]. Частоты замен С→Т и G→A снижаются до уровня частоты других замен после пятого–седьмого нуклеотида от начала/конца фрагмента [30]. Одним

из возможных объяснений наблюдаемого эффекта является наличие одноцепочечных выступающих концов в археологической ДНК, а скорость дезаминирования цитозина в одноцепочечных фрагментах на два порядка выше, чем в двухцепочечной ДНК [31].

По результатам секвенирования ДНК индивида № 93 проанализированы относительные частоты нуклеотидных замен С→Т и G→А. Относительные частоты рассчитаны как отношение С→Т-замен к количеству других возможных однонуклеотидных замен в конкретном положении от концов секвенированного фрагмента. На рис. 2 показано, что частоты замен С→Т и G→А резко увеличены на 5'- и 3'-концах ДНК, тогда как другие типы замен выявлены со значительно меньшей частотой.

#### Анализ Y-хромосомы

Для индивида № 93 проведен фрагментный анализ Y-хромосомы ДНК и получен его гаплотип (табл. 2). Полный 27-маркерный гаплотип с однозначным прочтением аллелей в STR-локусах указывает на сохранность Y-хромосомы в образце и на отсутствие контаминации со стороны современной или древней ДНК от других образцов. С помощью предиктора была предсказана гаплогруппа **N1a1a1a2 (Y9022)**. Данная гаплогруппа (исключительно редкая среди археологических образцов) была зафиксирована в недавней работе [32], посвященной поиску генетических корней венгров, среди образцов, обнаруженных при раскопках в Пермском крае. У индивидов могильника Брода 1 (возраст приблизительно 300 г. н.э.), относящегося к I ранней фазе неволинской культуры, и Баяново 2 (возраст приблизительно 820 г. н.э.), относящийся к поздней ломоватовской культуре определена точно такая же гаплогруппа. В исследовании [32] был проведен фрагментный анализ ДНК из археологических образцов по 17-маркерной панели Гаплотипы образцов Брода 1 и Баяново 2 приведены в табл. 3. У индивида Брода 1 обнаружено всего 8 аллелей, у индивида Баяново 2-11 аллелей из 17 возможных.

В настоящее время гаплогруппа **N1a1a1a2 (Y9022)** распространена в Волго-Уральском регионе среди татар, марийцев, удмуртов, чувашей, мордвы, местных русских и западносибирских популяциях хантов и манси, но при этом крайне

**Таблица 2.** Количественные параметры качества исследуемой ДНК

Образец	Концентрации фрагментов в выделенной ДНК (нг/мкл)			Степень деградации ДНК
	длинные фрагменты, нг/мкл	короткие фрагменты, нг/мкл	Y-хромосома, нг/мкл	
Первый зуб	0.178	0.254	0.567	1.43
Второй зуб	0.165	0.286	0.484	1.73

редко встречается у финноязычных народов [33–36]. В работе [36] был исследован современный генофонд коренных народов Удмуртии по обширной панели ДНК-маркеров. Аутосомные данные свидетельствуют о наибольшем генетическом сходстве удмуртов и бесермян с коми-пермяками [36]. Предсказание гаплогруппы является предварительным исследованием Y-хромосомы. Основной и точный результат по наличию Y-SNP, определяющий гаплогруппу, был получен с помощью NGS. С помощью NGS ДНК индивида № 93 была подтверждена и даже выявлена уточнённая терминальная субгаплогруппа **N1a1a1a2b (B181)**. При этом получены с надежным покрытием базальные варианты гаплогруппы **N** для индивида № 93, что указывает на достоверность результатов исследования (табл. 4).

#### NGS-секвенирование полной митохондриальной ДНК

Для индивида № 93 была получена полная нуклеотидная последовательность мтДНК путем ее NGS с помощью кастомной панели зондов. С помощью программы *haplogrep.org* определена митохондриальная гаплогруппа **U4** (табл. 5). Данную западно-евразийскую гаплогруппу можно было бы назвать “срединно-евразийской” [37]. Самые высокие частоты этой гаплогруппы сосредоточены не

на западе и не на востоке, а в центре Евразии. Частота максимальна в районе Урала (народы Приуралья, Урала и Западной Сибири несут от 10 до 30% U4). Повышенные частоты наблюдаются в Южной Азии (Пакистан) и в Восточной Европе. В других частях Западной Евразии гаплогруппа U4 редка, но повсеместна (частота около 1%, лишь местами поднимаясь до 5%) [37]. В Сибири (кроме Западной) встречены лишь единичные U [37, 38].

По данным NGS аутосомных SNP предсказан цвет глаз, волос и кожи с помощью онлайн программы HirisPlex [39]. Индивид № 93 с вероятностью 94,8% являлся носителем аллелей, определяющих голубой оттенок радужной оболочки глаз, с вероятностью 93,5% – светлых волос и 72,7% – промежуточного цвета кожи.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Появление первых поселенцев в верхнем течении р. Чепцы и, соответственно, начало формирования полумской культуры датируется рубежом IV–V вв. По проведенной датировке наш индивид жил в период сложения полумской культуры. Наиболее сходным с полумской культурой считается население, оставившее в этот же период на территории Пермской области курганные могильники харинского типа. Кроме пришлого “харинского” населения в формировании полумской культуры

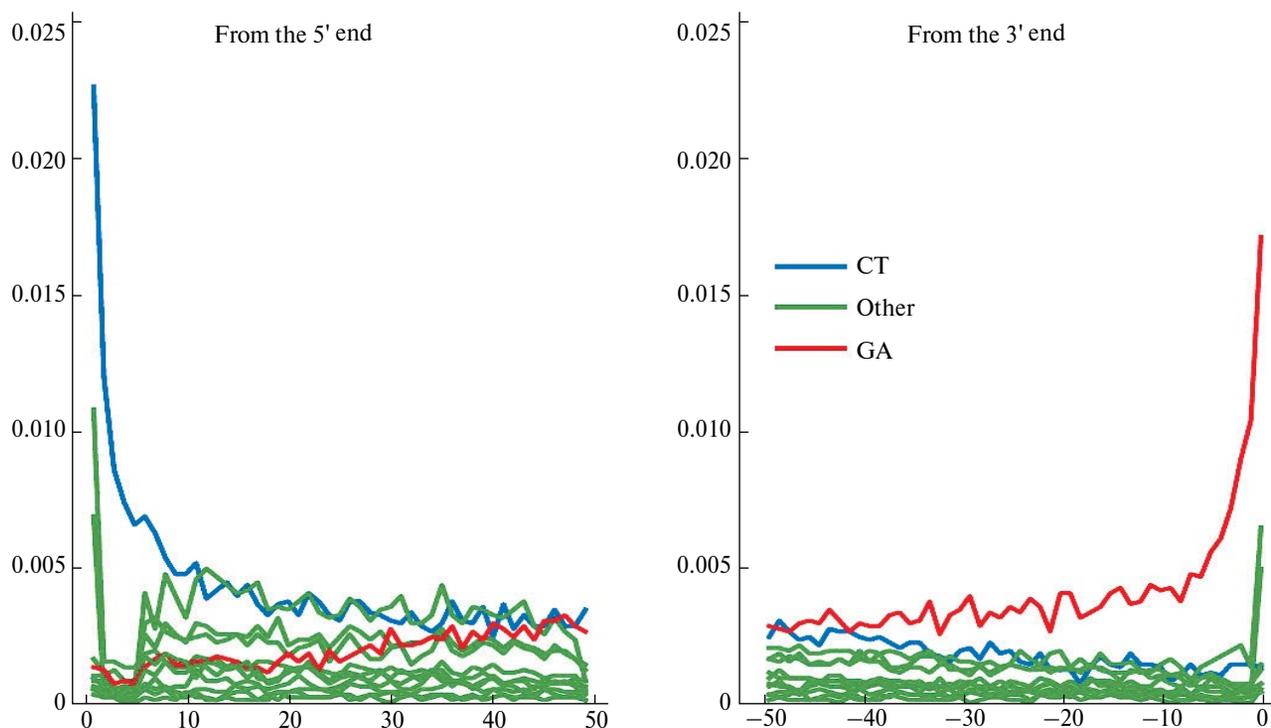


Рис. 2. Относительные частоты нуклеотидных замен. Синяя линия – С→Т-замены, красная линия – G→A-замены, зеленые линии – другие замены.

**Таблица 3.** Результаты фрагментного анализа, предсказавшего гаплогруппу **N1a1a1a2** (Y9022)

Источник	Наименование образца	Наименование и число аллелей STR-локусов												
		DYS393	DYS 390	DYS 19	DYS 391	DYS 385 a	DYS 385 b	DYS 439	DYS 389 I	DYS 392	DYS 389 II	DYS 458	DYS 437	DYS 448
Настоящая работа	93	13	23	14	10	11	14	10	15	14	31	16	14	20
[32]	Баянова 2	13			10	11	14		14			18	14	
[32]	Брода 1	13			10		14	10					14	

Источник	Наименование образца	Наименование и число аллелей STR-локусов													
		DYS 449	DYS 460	Y-GATA-H4	DYS 456	DYS 576	DYS 570	DYS 438	DYS 481	DYS 533	DYS 635	DYS 627	DYS 518	DYF387S1 a	DYF387S1 b
Настоящая работа	93	30	11	12	14	16	19	10	20	11	21	21	40	37	37
[32]	Баянова 2			11	14			10			21				
[32]	Брода 1			12	14						21				

**Таблица 4.** Результаты NGS образца № 93

Гаплогруппа	Определяющий маркер Y-SNP	rs Y-SNP	Позиции Y- SNP (GRCh38)	Полиморфизмы	Качество прочтений
N	M231; Page91	rs9341278	13357844	G→A	62
N~	S12897	rs905707184	10169444	C→T	51
N1	F1427; M2162	rs560132124	8972818	G→A	61
N1a1	M46; Page70; Tat	rs34442126	12810648	T→C	61
N1a1a	M178	rs377214926	19579869	C→T	121
N1a1a1a	L708; Z1951	rs562141282	7761471	C→A	261
N1a1a1a2	SK1506;	Y9283	8546305	T→G	27
N1a1a1a2	SK1504; Y10759		19744080	T→G	82
N1a1a1a2b	B181		3037493	C→G	246

**Таблица 5.** Результаты NGS полной митохондриальной ДНК

Номер образца	Полиморфизмы ДНК	Гаплогруппа
93	73G, 195C, 263G, 499A, 750G, 1438G, 1811G, 2706G, 4646C, 4769G, 5999C, 6047G, 7028T, 8860G, 11332T, 11467G, 11719A, 12308G, 12372A, 14620T, 14766T, 15326G, 15693C, 16356C	<b>U4</b>

участвовали местные племена Среднего Прикамья, относившиеся к гляденовской и мазунинской археологическим культурам [40].

Большинство археологов склоняются к приведенной выше схеме сложения северных удмуртов [41]. Однако ряд исследователей отрицают местное происхождение этой культуры и видят ее основателей среди тюркских пришлых групп [42, 43]. Серьезными аргументами в пользу первой гипотезы являются антропологические и генетические материалы. Исследования М.С. Акимовой показали, что в формировании населения полемской культуры приняли участие как верхнекамские, так и местные племена с превалированием первых [44]. Наиболее близкими к современным удмуртам являются группы коми, что показано в исследованиях населения по программам соматологии, дерматоглифики и популяционной генетики [45–47].

Комплексное исследование одного погребения представляет собой довольно редкую возможность получить исчерпывающую информацию об одном индивидуе. В свою очередь это позволяет провести сопоставления между разными системами признаков. В данном случае пол, определенный по костям скелета как мужской, полностью подтвердился наличием участков Y-хромосомы при генетическом анализе. Разумеется, мы далеки от вынесения окончательных суждений об этногенезе народов Волго-Камья на основании изучения одного погребения и выводы настоящего исследования можно трактовать лишь как относящиеся сугубо к одному индивиду, а сделанные обобщения носят безусловно предположительный характер. В нашем случае изучение данного индивида скорее свидетельствует в пользу местного происхождения населения полемской культуры, представителем которого он являлся.

Изученный индивид мужского пола среднего возраста (35–40 лет) характеризуется брахикранией, большими широтными размерами лица и черепа, некоторой уплощенностью в области орбит и скул. При этом нос выступает значительно. Более подробно внешний облик можно представить, взглянув на выполненные реконструкции, где в соответствии с генетическим анализом показаны светлые оттенки радужной оболочки глаз, кожи и волос. Этот облик полностью вписывается в круг форм уральского антропологического типа, характерного для современного населения региона.

Исследование посткраниального скелета позволило рассчитать прижизненную длину тела и выявить некоторые особенности телосложения. Рост индивида составлял порядка 166 см. Для раннего средневековья такая длина тела оценивается как средняя для мужского населения Европейской равнины.

Комплексные палеогенетические исследования индивида № 93 подтвердили принадлежность его к мужскому полу, позволили определить глубокий SNP его Y-хромосомной субгаплогруппы **N1a1a1a2b (B181)** и гаплогруппу **U4** мтДНК. Полученные гаплогруппы четко очерчивают их совместную приуроченность к центральной части Волго-Уральского региона. Генетические данные индивида № 93 по однородительским маркерам могут быть использованы как эталонные для их сравнения с другими результатами, получаемыми из других археологических образцов как более ранних, так и более поздних.

Важным результатом является то, что гаплогруппа, выявленная нами у индивида № 93 вариант гаплогруппы Y-хромосомы (**N-Y9022**) была обнаружена ранее у древнего населения, проживавшего на территории современной Пермской обл. в IV–VIII вв. [32]. А поскольку среди современных групп региона указанный вариант гаплогруппы весьма распространен, это может свидетельствовать в пользу преемственности населения Волго-Камья с начала первого тысячелетия до современности. В любом случае получены интересные научные сведения, поэтому в перспективе необходимо сделать исследование по нескольким могильникам региона, чтобы получить статистически достоверные сведения об этногенезе проживающего здесь населения.

Научное исследование осуществлялось в рамках реализации проекта “Остов сокровищ, победителя грантового конкурса “Общее дело” Благотворительного фонда В. Потанина (авторы А.С. Дёмин, Н.И. Криницына). Публикация подготовлена в рамках гранта, предоставленного Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (№ соглашения о предоставлении гранта: 075-15-2022-328).

Авторы выражают благодарность кандидату исторических наук А.Г. Иванову за консультации при подготовке историографической части.

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. *Алексеев В.П., Дебец Г.Ф.* Краниометрия. Методика антропологических исследований. М.: Наука, 1964. 128 с.
2. *Алексеев В.П.* Остеометрия. Методика антропологических исследований. М.: Наука, 1966. 249 с.

3. Герасимов М.М. Восстановление лица по черепу (современный и ископаемый человек). М.: Изд-во АН СССР, 1955. 585 с.
4. Веселовская Е.В. “Алгоритм внешности” — комплексная программа антропологической реконструкции // Вестник Моск. ун-та. Серия XXIII. Антропология. 2018. № 2. С. 38–54.
5. Handt O., Krings M., Ward R.H., Pääbo S. The retrieval of ancient human DNA sequences // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. P. 368–376.
6. Cooper A., Poinar H.N. Ancient DNA: Do it right or not at all // *Science*. 2000. V. 289. <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1139b>
7. Krings M., Stone A., Schmitz R.W. et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans // *Cell*. 1997. V. 90. P. 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80310-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80310-4)
8. Pääbo S., Poinar H., Serre D. et al. Genetic analyses from ancient DNA // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38 P. 645–679. <https://doi.org/10.1146/annurevgenet.37.110801.143214>
9. Willerslev E., Cooper A. Ancient DNA // *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2005. V. 272. P. 3–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>
10. Андреева Т.В., Малярчук А.Б., Сошкина А.Д. и др. Методология выделения древней ДНК из костной ткани для геномного анализа: подходы и практические рекомендации // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 9. С. 979–998. <https://doi.org/10.31857/S001667582209003X>
11. Жур К.В., Шарко Ф.С., Седов В.В. и др. Рюриковичи: первый опыт реконструкции генетического облика правящего рода средневековой Руси по данным палеогеномики // *Acta Nature*. 2023. Т. 15. № 3. С. 50–65.
12. Пилипенко А.С., Черданцев С.В., Трапезов Р.О. и др. К вопросу о генетическом составе сарматского населения Нижнего Поволжья (данные палеогенетики) // Вестник Волгоградского гос. ун-та. Серия 4. История. Регионоведение. Международные отношения. 2020. Т. 25. № 4. С. 17–50. <https://doi.org/10.15688/jvolsu4.2020.4.2>
13. Knapp M., Clarke A.C., Horsburgh K.N. et al. Setting the stage — building and working in an ancient DNA laboratory // *Ann. Anat.* 2012. V 194. № 1. P3–6. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.03.008>.
14. Adler C.J., Haak W., Donlon D., Cooper A. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. // *J. Archaeol. Sci.* 2011. V. 38. P. 956–964.
15. Dabney J., Knapp M., Glocke I. et al. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments // *Proc. Natl Acad. Sci.* 2013. № 110. P. 15758–15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
16. Стасюк И.В., Мустафин Х.Х., Альборова И.Э. “Славянская колонизация” водской земли: историография, проблемы, новые подходы // *Археология и культурная антропология*. 2020. № 5. С. 347–361.
17. Сиротин С.В., Богачук Д.С., Волошинов А.А. и др. Два необычных захоронения эпохи позднего средневековья в Бахчисарайском районе Республики Крым // *Краткие сообщения Института археологии*. 2019. № 256. С. 293–307.
18. Корниенко И.В., Панова Т.Д., Фалеева Т.Г. и др. Молекулярно-генетическая идентификация безымянных захоронений первой половины XVI в. из некрополя Вознесенского собора московского Кремля // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 2. С. 206–218. <https://doi.org/10.31857/S0016675822020072>
19. Корниенко И.В., Фалеева Т.Г., Шурр Т.Г. и др. Y-гаплогруппы костных останков из курганных погребений хазарского времени на территории юга России // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 4. С. 464–477. <https://doi.org/10.31857/S0016675821040044>
20. McKenna A., Hanna M., Banks E. et al. The genome analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Res.* 2010. P. 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr107524.110>
21. Schmiieder R., Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets // *Bioinform. Oxf. Engl.* 2011. № 27. P. 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
22. Иванов А.Г. Иванова М.Г., Останина Т.И., Шутова Н.И. Археологическая карта северных районов Удмуртии. Ижевск: Удм. ин-т истории, языка и литературы УРО РАН, 2004. 276 с.
23. Первухин Н.Г. Опыт археологического исследования Глазовского уезда Вятской губернии // *МАВ-ГР*. 1986. Вып. 2. С. 165–.
24. Кондратьева Г.Т., Стоянов В.Е. Археологические работы на р. Чепце // *Вопросы археологии Урала*. 1962. Вып. 2. С. 103–109.
25. Семёнов В.А. Тольёнский могильник IX–начала X вв. // *Новые исследования по древней истории Удмуртии*. 1988. С. 25–58.
26. Семёнов В.А. Отчёт о раскопках Тольёнского могильника и Тольёнского I селища в Дебёссском районе УАССР в 1986 г. // *Архив УИИЯЛ УрО РАН УдмФИЦ*. 1986. С. 2–31.
27. Тихонов А.Г. Физический тип средневекового населения Евразии по данным остеологии: Дис. ... канд. ист. наук. М.: Ин-т этнологии и антропологии РАН, 1997. 36 с.
28. Федосова В.Н. Общая оценка развития компонента мезоморфии по остеологическим данным (остеологическая методика) // *Вопр. антропологии*. 1986. Вып. 76. С.104–116.

29. Бунак В.В. Антропометрия. М.: Учпедгиз, 1941. 368 с.
30. Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F. et al. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 14616–14621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704665104>
31. Lindahl П. Instability and decay of the primary structure of DNA // Nature. 1993. V. 362. P. 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
32. Csáky V., Gerber D., Szeifert B. et al. Early medieval genetic data from Ural region evaluated in the light of archaeological evidence of ancient Hungarians // Sci. Rep. 2020. № 10. P19137. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75910-z>
33. Ilumae A.M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al. Human Y chromosome haplogroup N: A non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // Am. J. Hum. Genet. 2016. V. 99. № 1. P. 163–173.
34. Tambets K., Balanovsky O., Balanovska E. et al. The western and eastern roots of the Saami—the story of genetic “outliers” told by mitochondrial DNA and Y chromosomes // Am. J. Hum. Genet. 2004. V. 74. № 4. P. 661–682.
35. Трофимова Н.В., Литвинов С.С., Хуснутдинова Э.К. и др. Генетическая характеристика популяций Волго-Уральского региона по данным об изменчивости Y-хромосомы // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 120–127.
36. Балановская Е.В., Напольских В.В., Чураков В.С. и др. Генофонды удмуртов и бесермян в контексте финно-угорских и других окружающих народов: полногеномные и фармакогенетические данные // Ежегодник финно-угорских исследований. 2022. Т. 16. № 2. С. 328–346.
37. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. М.: Луч, 2007. 416 с.
38. Федорова С.А., Звенигороски В., Алексеев А.Н. Сравнительный анализ линий Y-хромосомы древних и современных саха (якутов) // Генетика. 2023. Т. 59. № 6. С. 633–639. <https://doi.org/10.31857/S001667582306005X>
39. Chaitanya L., Breslin K., Zuñiga S. et al. The HIRIS-Plex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation // Forensic Sci. Int. Genetics. 2018. V. 35. P. 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004>
40. Иванов А.Г. Древности Дебёсской земли. Ижевск: Монпоражён, 2014. 32 с.
41. Семёнов В.А. Этнокультурные элементы полемской культуры // Новые исследования по этногенезу удмуртов. 1989. С. 19–33.
42. Казаков Е.П. О полемской керамике Волго-Камья // Новые исследования по этногенезу удмуртов. 1989. С. 34–42.
43. Халиков А.Х. Некоторые новые аспекты в этногенезе удмуртского народа // Новые исследования по этногенезу удмуртов. 1989. С. 43–50.
44. Акимова М.С. Антропология древнего населения Прикамья. М.: Наука, 1968. 52 с.
45. Дубов А.И. Антропологическая характеристика северных и центральных удмуртов // Новые исследования по этногенезу удмуртов. 1989. С. 94–107.
46. Долинова Н.А. Дерматоглифика удмуртов // Новые исследования по этногенезу удмуртов. 1989. С. 108–122.
47. Шнейдер Ю.В., Тихомирова Е.В., Жукова О.В. и др. Антропогенетическое исследование удмуртского народа. Генетическая структура удмуртов по данным биохимических, иммунологических и физиологических маркеров генов // Новые исследования по этногенезу удмуртов. 1989. С. 130–146.

## Anthropology and Genetics of the Tolyonsky Burial Ground № 93. Udmurtia, Polomskaya Archaeological Culture

E. V. Veselovskaya<sup>1, 2, \*</sup>, Yu. V. Rashkovskaya<sup>2</sup>, A. S. Dyomin<sup>3</sup>, Kh. Kh. Mustafin<sup>4</sup>, I. E. Alborova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Russia State University for the Humanities, Moscow, 125993 Russia

<sup>2</sup>Miklukho-Maklai Institute of Ethnology and Anthropology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

<sup>3</sup>Ivanov Historical and Cultural Museum-Reserve «Idnakar», Glazov, 427622 Russia

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow Oblast, 141701 Russia

\*e-mail: veselovskaya.e.v@yandex.ru

The problems of the relationship between the cultures of the Volga-Kama region in general and the formation of the Udmurt ethnos involve scientists of various specializations. The main task of this work is to make a comprehensive description of the burial from the Tolyonsky burial ground located on the territory of the Debessky district of Udmurtia on the right bank of the Cheptsy river. Excavations were carried out by V.A. Semenov in 1980s. Archaeological and anthropological material is stored in the Historical and Cultural Museum-Reserve «Idnakar» named after M.G. Ivanova of the Udmurt Republic and attracted the attention of scientists in connection with the implementation of the grant. The absolute radiocarbon dating of the sample was obtained:  $1440 \pm 69$  years. The studied individual was distinguished by brachycephaly, large latitudinal dimensions of a face and a protruding nose shape. A scientific restoration of the appearance by the method of M.M. Gerasimov was carried out, contour and graphic portraits (full face and profile) were presented. Taking into account the results of genetic analysis, a watercolor artistic portrait was made. For the first time, comprehensive paleogenetic studies have been carried out on a representative of the Polomsky archaeological culture. The Y-chromosomal haplogroup **N1a1a1a2b (B181)** and the mitochondrial haplogroup **U4** have been established with high reliability. The identified haplogroups in individual No. 93 from the Tolyonsky burial ground along the male and female lines are geographically confined to the Central Volga-Ural region, which is consistent with the results of anthropological and archaeological research. With a probability of more than 97%, the color of the iris of the eyes is predicted to be blue in this individual.

**Keywords:** Polomskaya archaeological culture, Tolyonsky burial ground, craniology, osteology, anthropological reconstruction of appearance, ancient DNA, Y chromosome, mtDNA, NGS, SNP mutations, haplogroup, STR haplotype, mitotype.

УДК 577.21

**АССОЦИИРОВАННЫЙ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ  
КАРДИОМИОПАТИЕЙ НОВЫЙ ВАРИАНТ  
СО СДВИГОМ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ В ГЕНЕ *МУВРС3*  
ОПРЕДЕЛЯЕТ ЗНАЧИТЕЛЬНОЕ СНИЖЕНИЕ  
УРОВНЯ ТРАНСКРИПТА ЭТОГО ГЕНА В МИОКАРДЕ**

© 2024 г. И. С. Киселев<sup>1</sup>, М. С. Козин<sup>1,\*</sup>, Н. М. Баулина<sup>1</sup>, М. Б. Шарипова<sup>2</sup>, А. С. Зотов<sup>1</sup>,  
Е. А. Степанова<sup>3</sup>, Э. В. Курилина<sup>1</sup>, Г. Ж. Абдуллаева<sup>4</sup>, Д. А. Затейщиков<sup>1,5</sup>,  
О. О. Фаворова<sup>1</sup>, О. С. Чумакова<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии  
им. академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121552 Россия

<sup>2</sup>Бухарский областной многопрофильный медицинский центр, Бухара, 200100 Узбекистан

<sup>3</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, 125993 России

<sup>4</sup>Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр кардиологии,  
Ташкент, 100052 Узбекистан

<sup>5</sup>Городская клиническая больница № 17 Департамента здравоохранения города Москвы,  
Москва, 119620 Россия

\*e-mail: kozinmax1992@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2023 г.

После доработки 22.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самое распространенное наследственное заболевание сердца с частотой встречаемости 1 : 200–1 : 500 в общей популяции. В основе развития ГКМП в большинстве случаев лежат патогенные (или вероятно патогенные) варианты в восьми генах, кодирующих белки саркомера – основной сократительной единицы кардиомиоцитов, и в первую очередь – в гене *МУВРС3*; при этом варианты гена *МУВРС3* часто ассоциированы с относительно доброкачественным клиническим течением заболевания. Здесь мы описываем новый вариант гена *МУВРС3*, приводящий вследствие мутации со сдвигом рамки считывания NM\_000256.3:c.2781\_2782insCACA в гетерозиготном состоянии к семейной ГКМП. У пробанда, несмотря на оперативное вмешательство по устранению обструкции левого желудочка, сохранялась прогрессирующая сердечная недостаточность. Оценка уровней транскриптов мутантного аллеля и аллеля дикого типа гена *МУВРС3* в ткани миокарда пробанда, а также сравнение суммарного уровня транскриптов с контрольными образцами от пациентов без ГКМП показали значительное аллель-специфическое снижение уровня мутантного транскрипта. Полученные нами результаты расширяют спектр известных генетических вариантов с доказанной ролью в развитии ГКМП.

**Ключевые слова:** гипертрофическая кардиомиопатия; *МУВРС3*; новый генетический вариант; генетическое тестирование, анализ экспрессии гена.

**DOI:** 10.31857/S0016675824060101 **EDN:** VXPGKH

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самое распространенное (1 : 200 – 1 : 500 в общей популяции) генетическое заболевание сердца преимущественно с аутосомно-доминантным типом наследования, которое встречается с одинаковой частотой у мужчин и женщин и характеризуется возраст-зависимой пенетрантностью [1–3]. При ГКМП развивается, как правило, асимметричная гипертрофия стенок левого желудочка (ЛЖ),

степень которой не может быть объяснена только гемодинамическими нарушениями; в двух третях случаев процесс приводит к обструкции выводного отдела ЛЖ (ВОЛЖ) [3]. Клиническое течение ГКМП отличается выраженной гетерогенностью: одни больные остаются бессимптомными в течение длительного времени, у других развиваются такие неблагоприятные события как прогрессирующая

сердечная недостаточность, фибрилляция предсердий и эмболические инсульты, третьи внезапно умирают в молодом возрасте [3]. Согласно исследованиям последнего десятилетия, клиническая вариабельность заболевания определяется сочетанием его сложной генетической архитектуры [4] и воздействия ненаследственных факторов [5].

Наследственная природа ГКМП была впервые продемонстрирована в 1989 г., когда была показана ассоциация локуса 14q1 с заболеванием [6]. За 30 лет изучения описано, согласно базе данных ClinVar-NCBI, более 1000 патогенных и около 300 вероятно патогенных вариантов с доказанной ролью в развитии заболевания. Этих вариантов (96%) было обнаружено в восьми генах, кодирующих саркомерные белки [7], причем один из этих генов, *MYBP3*, кодирующий миозин-связывающий белок С3 (MyBP-C), становится причиной заболевания чаще других (44% генотип-положительных случаев) [8]. Для *MYBP3*-ассоциированной ГКМП характерны более поздний дебют и, как правило, более благоприятное течение в сравнении с ГКМП, связанной с другими генами белков саркомера [9–10]. Однако некоторые варианты гена *MYBP3* ассоциированы с тяжелым фенотипом и неблагоприятным исходом [11–12]. Несмотря на большое количество зарегистрированных генетических вариантов, ассоциированных с ГКМП, многие из них не повторяются в популяции, что затрудняет точную классификацию их патогенности из-за отсутствия доказательств в сегрегационных и функциональных исследованиях.

В настоящей работе мы описываем новый вариант NM\_000256.3:c.2781\_2782insCACA гена *MYBP3* со сдвигом рамки считывания, который выявлен в семье больных ГКМП с тяжелой формой заболевания у пробанда, и приводим данные анализа экспрессии мутантного гена *MYBP3* в ткани сердца человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Клинические данные пробанда*

Женщина 44 лет была госпитализирована в Городскую клиническую больницу № 17 г. Москвы с жалобами на сердцебиения и одышку в рамках III функционального класса по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца (New York Heart Association, NYHA). Из анамнеза стало известно, что в возрасте 20 лет, после рождения первого ребенка, у нее были впервые зарегистрированы признаки патологии сердца, однако диагноз установлен не был. В возрасте 30 лет впервые появилась одышка, которая прогрессировала до III класса по NYHA в течение последующих десяти лет. В

возрасте 40 лет была диагностирована обструктивная форма ГКМП, но от предложенной операции пациентка отказалась. При обследовании в Городской клинической больнице № 17 на электрокардиограмме (ЭКГ) регистрировались “рубцовые” изменения. Эхокардиография (ЭХОКГ) выявила асимметричную гипертрофию межжелудочковой перегородки (23 мм), удлинение и передне-систолическое движение передней створки митрального клапана с тяжелой обструкцией ВОЛЖ (148 мм рт. ст. в покое), “псевдонормальный” тип диастолической дисфункции ЛЖ ( $E/e = 16.7$ ), расширение левого предсердия и умеренную степень митральной регургитации. Фракция выброса (ФВ) ЛЖ составила 64%. Магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца дополнительно показала смещение прикрепления папиллярных мышц в сторону верхушки и накопление гадолиния в отсроченную фазу контрастирования. Уровень мозгового натрийуретического пептида в крови составил 1247 пг/мл. Пациентке в возрасте 45 лет была проведена хирургическая миосептэктомия по Морроу, достигнуто значительное снижение градиента давления в ВОЛЖ и облегчение симптомов. В последующие два года наблюдения сохранялась одышка в рамках II класса по NYHA, градиент давления в ВОЛЖ составлял 35 мм рт. ст. в покое и 45 мм рт. ст. после проведения провоцирующей пробы Вальсальвы. На ЭКГ регистрировалась полная блокада левой ножки пучка Гиса. В возрасте 47 лет было отмечено прогрессирование сердечной недостаточности: одышка III класса по NYHA, периферические отеки, потребность в диуретиках. На ЭХОКГ регистрировалась небольшая обструкция ВОЛЖ (35 мм рт. ст.), сохраненная ФВ ЛЖ (60%) и снижение глобальной продольной систолической деформации ЛЖ (17%).

### *Клинические данные членов семьи*

На базе Бухарского областного многопрофильного медицинского центра (Узбекистан) проведено клиническое обследование 10 членов семьи пробанда (табл. 1). У ее матери (I.2), страдающей артериальной гипертензией, выявлена гипертрофия миокарда ЛЖ с максимальной толщиной стенок ЛЖ 12 мм, что не соответствует критерию ГКМП. Отец (I.1) был недоступен для обследования; он умер внезапной смертью в возрасте 43 лет. У пробанда есть брат-близнец (II.4) с жалобами на одышку, боли в груди и сердцебиения, у которого в возрасте 45 лет также была диагностирована ГКМП. Еще у одного брата (II.2), моложе близнецов на два года, у которого не было жалоб, ЭХОКГ показала диастолическую дисфункцию ЛЖ и расширение левого предсердия; гипертрофия миокарда на ЭХОКГ не определялась; проведение МРТ сердца было не доступно. Никто из других

**Таблица 1.** Клинические характеристики пациента – носителя варианта с.2781insCACA (II.3) в гене *MYBPC3* и членов семьи

Номер пациента	Пол, возраст на момент осмотра (лет), связь с пробандом	Клинические симптомы	Электрокардиография	Эхокардиография
I.1	М (43), отец	ВСС	–	–
I.2	Ж (69), мать	Одышка	Депрессии ST в V4-V6	Симметричная ГЛЖ 12мм; диастолическая дисфункция ЛЖ
II.1	М (36), брат	Нет	Норма	Пролапс МК
II.2	М (43), брат	Нет	–	Диастолическая дисфункция ЛЖ; расширение ЛП; пролапс МК
II.3	Ж (45), пробанд	Одышка, боль в груди, сердцебиения	Патологические зубцы Q	Асимметричная ГЛЖ 28мм; обструкция ВОЛЖ; диастолическая дисфункция ЛЖ; асширение ЛП; удлинение створок МК
II.4	М (45), брат-близнец	Одышка	СРРЖ в нижних отведениях	Асимметричная ГЛЖ 16мм; диастолическая дисфункция ЛЖ; расширение ЛП; пролапс МК
III.1	Ж (15), племянница	Нет	–	Норма
III.2	Ж (9), племянница	Нет	–	Норма
III.3	М (26) сын	Нет	СРРЖ в нижних отведениях	Норма
III.4	Ж (22), дочь	Нет	Норма	Норма
III.5	Ж (17), племянница	Нет	СРРЖ в нижних отведениях	Норма

Примечание. Ж – женщина; М – мужчина; ВСС – внезапная сердечная смерть; ЛЖ – левый желудочек; ГЛЖ – гипертрофия ЛЖ; МК – митральный клапан; ЛП – левое предсердие; ВОЛЖ – выводной отдел ЛЖ; СРРЖ – синдром ранней реполяризации желудочков.

обследованных родственников не имел жалоб и признаков ГКМП на ЭХОКГ.

### *Таргетное секвенирование*

ДНК выделяли из образцов крови с помощью набора DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия). Таргетное секвенирование у пробанда 19 генов, ассоциированных с ГКМП и ее основными фенотипами (*ACTC1, ALPK3, DES, FHL1, FHOD3, GLA, LAMP2, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, PRKAG2, RPTN11, TNNC1, TNNT2, TPM1, TRIM63* и *TTR*), выполнено в лаборатории Health in Code (Испания). Принимая во внимание достаточно тяжелое клиническое проявление заболевания у пробанда, в той же лаборатории проведено дополнительное секвенирование 232 генов, ассоциированных с наследственными заболеваниями сердца (общая панель кардиомиопатий, аритмий и внезапной смерти, Health in Code).

### *Генотипирование*

Валидацию результатов таргетного секвенирования у пробанда и генотипирование образцов ДНК всех живых родственников пробанда, представленных в табл. 1, проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера с олигонуклеотидными праймерами, фланкирующими область мутации: 5'-TGCCATTGAGCAGATTCACCT-3' и 5'-GTGTCAATGGCGGGTCTTGT-3'.

### *Получение образцов ткани сердца и гистологическое исследование*

Образец миокарда ЛЖ пробанда (П.3), полученный в ходе миоэктомии из проксимального участка межжелудочковой перегородки непосредственно под правой коронарной створкой аортального клапана, был разделен на два фрагмента. Один фрагмент хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в растворе RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США) для последующего анализа экспрессии гена *MYBPC3*. Второй фрагмент был помещен в 10% нейтральный буферный раствор формалина, дегидратирован и фиксирован в парафине по стандартной методике. Срезы с парафиновых блоков были окрашены гематоксилином и эозином (обзорная стандартная окраска), а также дополнительно по методу Ван-Гизона (визуализация коллагеновых волокон), Конго красным (визуализация амилоида в поляризованном свете) и реактивом Шиффа (визуализация гликогена). Образцы были исследованы с помощью поляризационного микроскопа Leica DM2000 (Великобритания).

Образцы миокарда ЛЖ пациентов без ГКМП (контрольная группа для анализа экспрессии генов) были получены от 14 пациентов со вторичной

гипертрофией миокарда ЛЖ, развившейся вследствие тяжелого аортального стеноза (АС) (35.7% женщин, возраст  $60.4 \pm 9.0$  лет, максимальная толщина стенки ЛЖ  $16.6 \pm 3.3$  мм). Эти образцы были получены из аналогичного участка межжелудочковой перегородки в ходе операции по протезированию аортального клапана и хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в растворе RNeasy Lysis Buffer.

Все манипуляции были проведены одним хирургом, А.С. Зотовым.

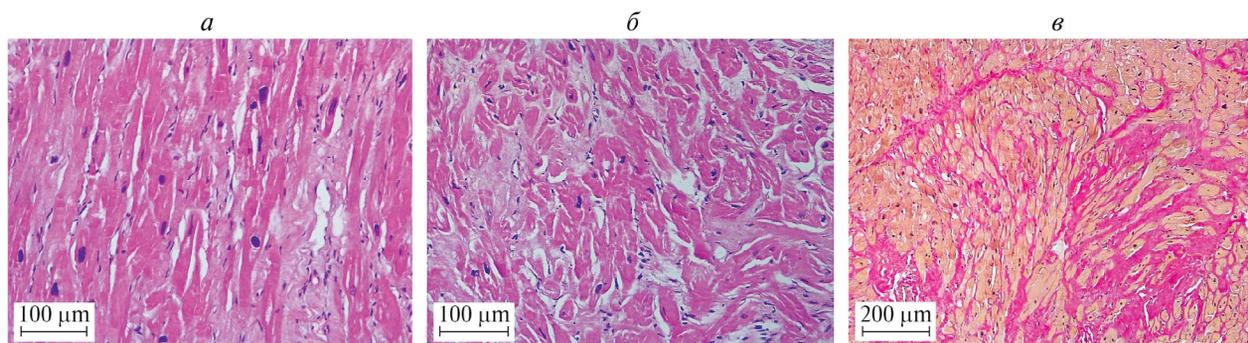
### *Анализ экспрессии гена MYBPC3 в миокарде пробанда*

Фрагмент миокарда ЛЖ пробанда, хранившийся в растворе RNeasy Lysis Buffer при  $-20^{\circ}\text{C}$ , был разделен на три части, которые в дальнейшем обрабатывали независимо друг от друга с получением трех технических реплик. Все образцы сердечной ткани пробанда и пациентов с АС гомогенизировали с помощью шаровой мельницы TissueLyser LT (Qiagen, США). Тотальную РНК выделяли из разрушенных тканей с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen); ее чистоту оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Тотальную РНК каждого образца подвергали обратной транскрипции с помощью набора High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ThermoFisher Scientific) и использовали полученную кДНК для количественной ПЦР. Реакцию проводили с применением SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) и трех пар олигонуклеотидных праймеров: 5'-CTGACAGAGCACACACA-3' и 5'-CCCGACCTTCTTCTGAATGG-3' для мутантного транскрипта гена *MYBPC3*, 5'-CTGACAGAGCACACATCGAT-3', 5'-TGAGAAGGTTTCACAGGCTCC-3' для транскрипта дикого типа, 5'-G C A C A C A A T A T G C C A G G G C - 3' и 5'-TGGAAAGGGATGAGAAGGTTCA-3' – неспецифично для обоих транскриптов (в трех повторах для каждой пары праймеров). Все праймеры были сконструированы таким образом, чтобы охватывать стык между экзонами 27 и 28. В качестве эндогенного контроля использовали транскрипт гена *GAPDH*, детектируемый с помощью праймеров 5'-GACTCATGACCACAGTCCATGC-3' и 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'. Вычисление относительной кратности экспрессии гена *MYBPC3* проводили с помощью метода дельта-дельта Ct [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Гистопатология миокарда пробанда*

Гистологический анализ биопсийного материала пробанда выявил признаки, которые с учетом



**Рис. 1.** Гистологический анализ биопсии миокарда пробанда. *a* – гипертрофия кардиомиоцитов и ядерный полиморфизм, окраска гематоксилином и эозином; *б* – беспорядочное расположение и гипертрофия кардиомиоцитов, окраска гематоксилином и эозином; *в* – интерстициальный фиброз: коллагеновые волокна (фиолетово-красный), кардиомиоциты (желтый), окраска по Ван-Гизону.

клинических данных являются характерными для ГКМП [14]: гипертрофию кардиомиоцитов (некоторые кардиомиоциты имели ширину до 40 микрон), ядерный полиморфизм (рис. 1, *a*), увеличенные и в значительной мере беспорядочно расположенные кардиомиоциты (феномен “disarray”) (Рис. 1, *б*), интерстициальный фиброз с эффектом “замурованных” кардиомиоцитов в отдельных участках (рис. 1, *в*).

При исследовании в поляризованном свете препаратов, окрашенных Конго красным, амилоид не выявлен; при постановке ШИК-реакции наблюдали относительно равномерное накопление гликогена в кардиомиоцитах. Таким образом, были исключены основные фенкопии ГКМП – амилоидоз и гликогенозы.

#### *Идентификация нового генетического варианта у пробанда*

Таргетное секвенирование 19 генов, ассоциированных с ГКМП и ее основными фенкопиями, выявило у пробанда (пациент П.3) ранее не описанный вариант NM\_000256.3:c.2781\_2782insCACA (далее с.2781insCACA) в гетерозиготном состоянии. Мы классифицировали данный вариант как вероятно патогенный в соответствии с совместными рекомендациями Американской коллегии медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) и Ассоциации молекулярной патологии (Association for Molecular Pathology, AMP) [15]. Этот вариант представляет собой дубликацию четырех пар оснований в 27 экзоне гена *MYBPC3*, которая приводит к сдвигу рамки считывания, изменению кодируемой аминокислотной последовательности, начиная с кодона Ser928 (NP\_000247.2:p.S928Hfs\*124), и появлению преждевременного стоп-кодона через 123 основания к 3'-концу от данной мутации. Дополнительное секвенирование 232 генов, связанных с

кардиомиопатиями, аритмиями и внезапной смертью, не выявило других редких вариантов, которые могли бы объяснить формирование фенотипа ГКМП у пробанда.

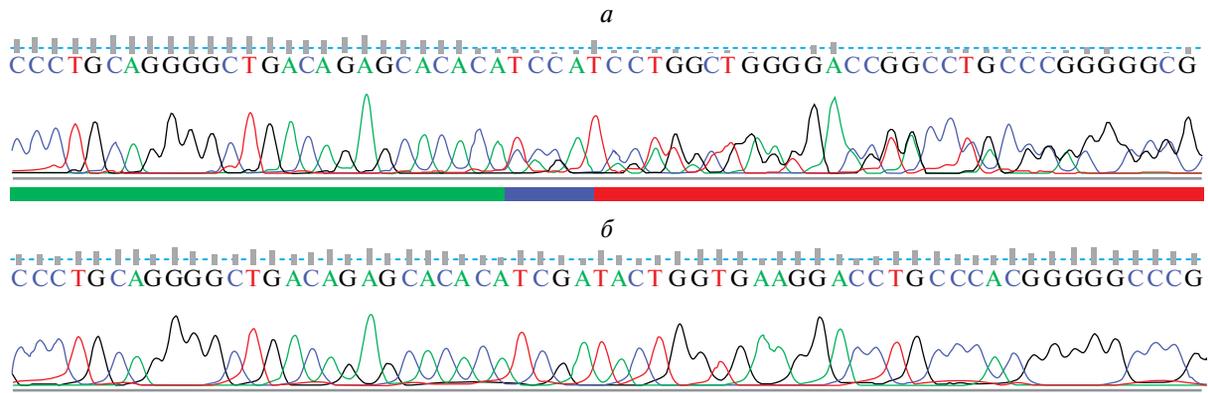
#### *Анализ данных генотипирования ДНК пробанда и членов семьи*

Мы воспроизвели полученные с помощью таргетного секвенирования данные о носительстве пробандом (пациент П.3 с ГКМП) варианта с.2781insCACA с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Гетерозиготное носительство 4-нуклеотидной вставки приводит к сдвигу рамки считывания, которая на электрофореграмме выглядит как “удвоенная последовательность”, начиная от места вставки и до 3'-конца фрагмента (рис. 2, *a*). Идентифицированный вариант описан впервые и не представлен в имеющихся базах данных (gnomAD, ExAC, ESP, dbSNP, ClinVar), поэтому информация о нем направлена в базу данных ClinVar, идентификатор – SCV003935995.

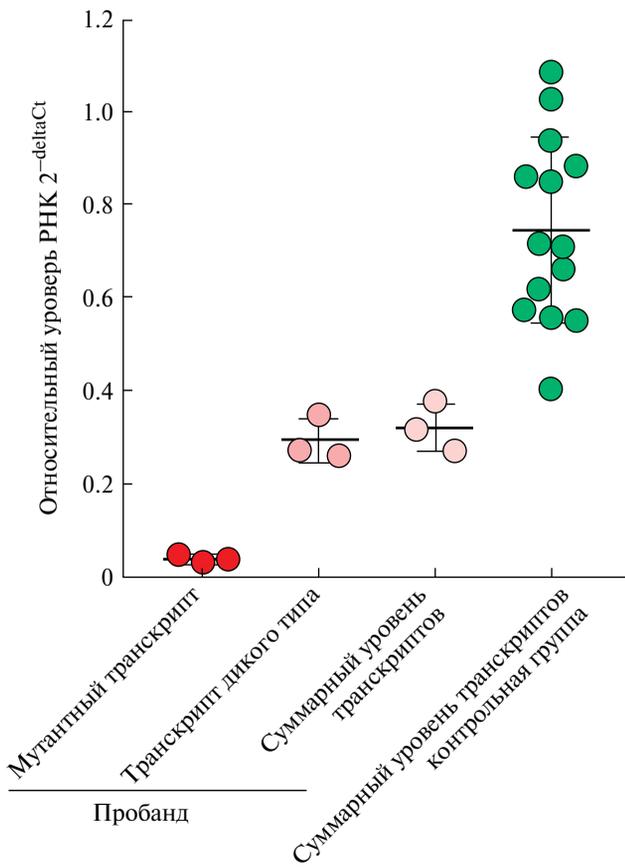
Аналогичный анализ был проведен в девяти доступных образцах ДНК родственников пациента. Четверо из родственников пробанда (П.2, П.4, П.1 и П.5, табл. 1), в том числе брат-близнец с диагнозом ГКМП, оказались носителями описываемой новой мутации, другие пять (I.2, П.1, П.2, П.3, П.4, табл. 1) не были носителями. Электрофореграмма одного из здоровых родственников без мутации, П.2, представлена на рис. 2, *б*.

#### *Анализ экспрессии гена MYBPC3*

Мы измерили уровни зрелых мРНК-транскриптов мутантного и дикого типов гена *MYBPC3* в тотальной РНК из ткани ЛЖ пробанда и оценили их соотношение (рис. 3). Видно, что относительный уровень мутантной мРНК *MYBPC3* оказался почти на порядок ниже, чем мРНК дикого типа



**Рис. 2.** Результаты секвенирования по Сэнгеру области гена *MYBPC3* у пациента с ГКМП П.3 (пробанда), носителя варианта с.2781insCACA в гетерозиготном состоянии (электрофореграмма *а*), и у пациента П.2, не являющегося носителем (электрофореграмма *б*). На электрофореграмме *а* зеленой полосой показан регион в 5'-области от индексного варианта, синей полосой – инсерция TG TG, оранжевой полосой – “удвоенная последовательность” в 3'-области от варианта.



**Рис. 3.** Относительные уровни транскриптов гена *MYBPC3* в ткани левого желудочка пробанда и 14 пациентов с аортальным стенозом, составивших контрольную группу. Для пробанда анализ проводился независимо в трех фрагментах миокарда (три технических повтора). Уровни изучаемых транскриптов рассчитывались относительно уровня экспрессии гена *GAPDH*. Данные представлены в виде графика рассеяния (среднее значение со стандартным отклонением).

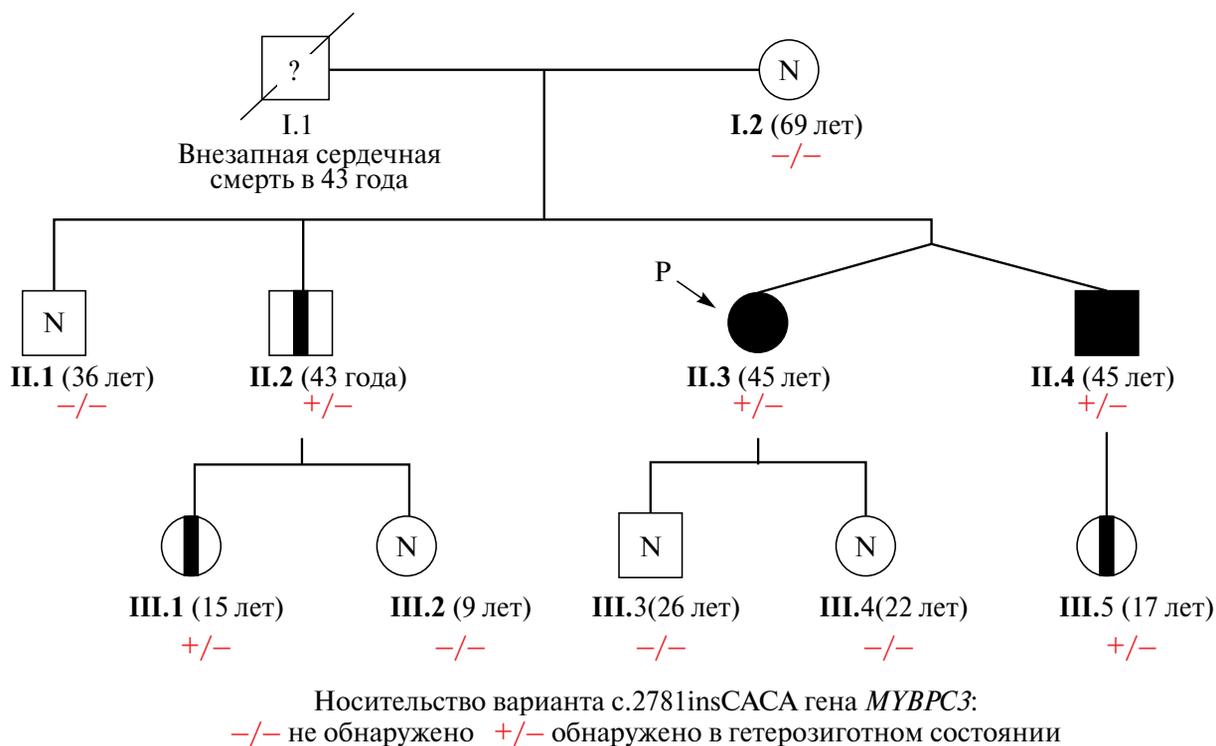
(0.040 и 0.29 соответственно), а кратность изменения (fold change) составила 0.14, что может объясняться деградацией транскрипта по механизму нонсенс-опосредованного распада мРНК [16].

Далее мы сравнили суммарные уровни мРНК-транскриптов *MYBPC3* в ткани ЛЖ пробанда и в ткани ЛЖ 14 пациентов с АС, составивших в нашем исследовании контрольную группу (рис. 3). Уровень транскриптов *MYBPC3* у пробанда оказался примерно в два раза ниже, чем в среднем в контрольной группе ( $0.32 \pm 0.05$  против  $0.75 \pm 0.20$ , fold change = 0.43). Эти данные свидетельствуют о том, что мутантный аллель практически не вносит вклада в общий уровень транскрипции *MYBPC3*.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на выявление многих генетических вариантов, ассоциированных с ГКМП, наши представления о патогенезе заболевания – от мутации к фенотипу – остаются неполными, что во многом определяется недоступностью адекватного объекта исследования. Действительно, фенотипы ГКМП человека только частично воспроизводятся на модельных животных [17], а возможности исследовать ткани сердца человека по понятным причинам крайне ограничены, особенно применительно к мутации в конкретном гене.

В настоящей работе мы обнаружили новый вариант с.2781insCACA в гене *MYBPC3* у больной ГКМП и проследили характер наследования этого варианта в её семье (рис. 4). Кроме того, мы оценили влияние варианта с.2781insCACA на уровень мРНК *MYBPC3* в образце миокарда ЛЖ пробанда, частично восполнив описанный выше дефицит исследований механизмов развития ГКМП на ткани сердца человека.



**Рис. 4.** Родословная пациента с ГКМП II.3 (пробанд, показан стрелкой), носителя варианта с.2781insCACA в гене *MYBPC3*. Символы со сплошной заливкой – носители варианта, у которых подтверждена ГКМП; символы с вертикальной черной полосой внутри – бессимптомные носители варианта; N – родственники пробанда, не являющиеся носителями варианта; ? – отец пробанда с неизвестным генотипом и фенотипом (предположительно носитель варианта с заболеванием).

Обнаруженный вариант с.2781insCACA имеет типичное для ГКМП-ассоциированных патогенных вариантов аутомно-доминантное наследование; с высокой вероятностью он был передан пробанду от отца, который внезапно умер в возрасте 43 лет и поэтому был недоступен для генетического тестирования. Согласно адаптированной версии ACMG/AMP, созданной экспертной группой ClinGen Inherited Cardiomyopathy Expert Panel (CMP-EP) [18], количество членов семьи с установленным фенотипом ГКМП (пробанд II.3 и ее брат-близнец II.4) недостаточно для сегрегации индексного варианта с ГКМП. Однако в исследуемой семье не было генотип-отрицательных членов с ГКМП, а отсутствие фенотипа заболевания у более молодых носителей с.2781insCACA можно объяснить зависящей от возраста неполной пенетрантностью, характерной для всех наследственных кардиомиопатий. Нельзя, однако, исключить и протективный эффект других генетических факторов.

Известно, что большинство (91%) ГКМП-ассоциированных вариантов гена *MYBPC3* относятся к вариантам усечения белка (protein truncating variants, PTV), приводя к формированию

преждевременного стоп-кодона в мутантной мРНК [19]. Такая мРНК может либо быстро деградировать еще до этапа трансляции, либо транслироваться в нефункциональный укороченный белок, который, в свою очередь, может разрушаться под действием убиквитин-протеасомной системы клетки [20–21]. Оба сценария приводят к гаплонедостаточности МуВР-С, что, согласно [19, 22], служит основным механизмом возникновения ГКМП у носителей PTV в гене *MYBPC3*, а также у носителей некоторых миссенс-вариантов в этом гене. Роль гаплонедостаточности, как ведущего механизма развития *MYBPC3*-ассоциированной ГКМП, подтверждает также успешное применение заместительной генной терапии, которая привела к повышению экспрессии МуВР-С дикого типа и уменьшению гипертрофии миокарда [23].

Для оценки влияния с.2781insCACA на экспрессию гена *MYBPC3* в ткани сердца мы провели аллель-специфический анализ уровней зрелых транскриптов этого гена в образце миокарда ЛЖ пробанда и показали, что уровень транскрипта *MYBPC3*, содержащего индексный вариант, в семь раз ниже уровня транскрипта дикого типа. Полученные нами результаты находятся в соответствии

с данными [24], согласно которым среднее соотношение транскриптов мутантного и дикого типа составляло примерно 1 : 5. Соответственно, наблюдавшийся нами вклад транскрипта мутантного аллеля гена *MYBPC3* в суммарный уровень транскриптов *MYBPC3*, экспрессируемых обоими аллелями этого гена, был незначительным: у пробанда уровень мРНК *MYBPC3* составлял примерно половину среднего уровня в контрольной группе.

Скорее всего, основной причиной наблюдаемого в нашей работе и работе [24] снижения уровня мутантных транскриптов гена *MYBPC3* по сравнению с транскриптом дикого типа является нонсенс-опосредованный распад РНК. Однако это не исключает возможности синтеза усеченного белка p.Ser928Hisfs\*124. Для решения этого вопроса необходимы дополнительные эксперименты. Здесь уместно отметить, что другой вариант гена *MYBPC3*, с.2833\_2834del, расположенный на расстоянии 48 нуклеотидов к 3'-концу от с.2781insCACA, кодирует тот же усеченный белок p.Ser928Hisfs\*124 и классифицирован как патогенный, так как был выявлен у нескольких неродственных больных [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/42660/>], а также показал сегрегацию с заболеванием в семье [25].

В ряде предшествующих исследований с использованием ткани сердца человека, в которых укороченный белковый продукт PTVs гена *MYBPC3* не детектировался, параллельно наблюдалось снижение уровня полноразмерного MyBP-C [24, 26–28]. Есть данные, что синтезированные усеченные белки могут не разрушаться протеасомами, а вызывать их дисфункцию, что в свою очередь приводит к нарушению деградации других прогипертрофических факторов, внося вклад в патогенез ГКМП [29, 30], а невозможность определения усеченного MyBP-C может быть обусловлена сниженной аффинностью связывания мутантных белков с доступными на сегодняшний день антителами [28].

В нашем исследовании у пробанда наблюдалось тяжелое клиническое течение ГКМП с прогрессирующей сердечной недостаточностью даже после хирургического устранения обструкции ЛЖ. Параллельного носительства пробандом других генетических вариантов, которое могло бы объяснить наблюдаемую клиническую картину, не типичную для *MYBPC3*-ассоциированной ГКМП, мы не выявили, что согласуется с представлением о патогенности варианта с.2781insCACA.

В целом в настоящем исследовании мы расширили панель вариантов в гене *MYBPC3*, ассоциированных с клиническим фенотипом ГКМП. Полученные данные согласуются с представлением, что обнаруженный сдвиг рамки считывания в гене *MYBPC3* приводит к образованию мутантной мРНК, которая быстро деградирует, вероятно,

в результате нонсенс-опосредованного распада мРНК.

В нашей работе мы не проводили анализа белкового продукта гена *MYBPC3*; в контрольной группе отсутствовали образцы миокарда здоровых людей; все родственники пробанда проживают в другой стране, что затруднило их клиническое обследование.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00353).

Исследование одобрено локальным Этическим комитетом ГKB № 17 25.10.2019, протокол № 8.

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 или их законных представителей было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maron B.J., Gardin J.M., Flack J.M. et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary artery risk development in (young) Adults // *Circulation*. 1995. V. 92. P. 785–789. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.4.785>
2. Semsarian C., Ingles J., Maron M.S., Maron B.J. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015. V. 65. P. 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.01.019>
3. Authors/Task Force members, Elliott P.M., Anastakis A. et al. ESC guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the task force for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC) // *Eur. Heart. J.* 2014. V. 35. P. 2733–2779. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu284>
4. Watkins H. Assigning a causal role to genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2013. V. 6. № 1. P. 2–4. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.000032>
5. Harper A.R., Goel A., Grace C. et al. Common genetic variants and modifiable risk factors underpin hypertrophic cardiomyopathy susceptibility and expressivity //

- Nat. Genet. 2021. V. 53. № 2. P. 135–142.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-020-00764-0>
6. Jarcho J.A., McKenna W., Pare J.A. et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1 // N. Engl. J. Med. 1989. V. 321. № 20. P. 1372–1378.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM198911163212005>
  7. Christian S., Cirino A., Hansen B. et al. Diagnostic validity and clinical utility of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review and meta-analysis // Open Heart. 2022. V. 9. № 1.  
<https://doi.org/10.1136/openhrt-2021-001815>
  8. Ingles J., Goldstein J., Thaxton C. et al. Evaluating the clinical validity of hypertrophic cardiomyopathy genes // Circ. Genom. Precis. Med. 2019. V. 12. № 2.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.119.002460>
  9. Charron P., Dubourg O., Desnos M. et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene // Circulation. 1998. V. 97. № 22. P. 2230–2236.  
<https://doi.org/10.1161/01.cir.97.22.2230>
  10. Niimura H., Bachinski L.L., Sangwatanaroj S. et al. Seidman, mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy // N. Engl. J. Med. 1998. V. 338. № 18. P. 1248–1257.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199804303381802>
  11. Calore C., De Bortoli M., Romualdi C. et al. A founder MYBPC3 mutation results in HCM with a high risk of sudden death after the fourth decade of life // J. Med. Genet. 2015. V. 52. № 5. P. 338–347.  
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102923>
  12. Нязова С.С., Чакова Н.Н., Комиссарова С.М., Сасинович М.А. Спектр мутаций в генах саркомерных белков и их фенотипическое проявление у белорусских пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // Мед. генетика. 2019. Т. 18. № 6. С. 21–33.  
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.06.21-33>
  13. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method // Methods. 2001. T. 25. № 4. С. 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
  14. Sutton M.G.St.J., Lie J.T., Anderson K.R. et al. Histopathological specificity of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Myocardial fibre disarray and myocardial fibrosis // Br. Heart J. 1980. V. 44. № 4. P. 433–443.  
<https://doi.org/10.1136/hrt.44.4.433>
  15. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology // Genet. Med. 2015. V. 17. P. 405–424.  
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
  16. Nickless A., Bailis J.M., You Z. Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway // Cell. Biosci. 2017. V. 7. P. 26.  
<https://doi.org/10.1186/s13578-017-0153-7>
  17. Duncker D.J., Bakkens J., Brundel B.J. et al. Animal and in silico models for the study of sarcomeric cardiomyopathies // Cardiovasc. Res. 2015. V. 105. № 4. P. 439–448.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvv006>
  18. Kelly M.A., Caleshu C., Morales A. et al. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen’s Inherited Cardiomyopathy Expert Panel // Genet. Med. 2018. V. 20. P. 351–359.  
<https://doi.org/10.1038/gim.2017.218>
  19. Helms A.S., Thompson A.D., Glazier A.A. et al. Spatial and functional distribution of MYBPC3 pathogenic variants and clinical outcomes in patients with hypertrophic cardiomyopathy // Circ. Genom. Precis. Med. 2020. V. 13. P. 396–405.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.120.002929>
  20. Vignier N., Schlossarek S., Fraysse B. et al. Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice // Circ. Res. 2009. V. 105. P. 239–248.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201251>
  21. Sarikas A., Carrier L., Schenke C. et al. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants // Cardiovasc. Res. 2005. V. 66.1. P. 33–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.004>
  22. Andersen P.S., Havndrup O., Bundgaard H. et al. Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosin-binding protein C (MYBPC3) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency // Eur. J. Hum. Genet. 2004. V. 12. № 8. P. 673–677.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201190>
  23. Prondzynski M., Krämer E., Laufer S.D. et al. Evaluation of MYBPC3 trans-splicing and gene replacement as therapeutic options in human iPSC-derived cardiomyocytes // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2017. V. 16. № 7. P. 475–486.  
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.05.008>
  24. Helms A.S., Davis F.M., Coleman D. et al. Sarcomere mutation-specific expression patterns in human hypertrophic cardiomyopathy // Circ. Cardiovasc. Genet. 2014. V. 7. P. 434–443.  
[-10.1161/CIRCGENETICS.113.000448](https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000448)

25. *Anan R., Niimura H., Minagoe S. et al.* A novel deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene as a cause of Maron's type IV hypertrophic cardiomyopathy // *Am. J. Cardiol.* 2002. V. 89. № 4. P. 487–488.  
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(01\)02281-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(01)02281-0)
26. *van Dijk S.J., Dooijes D., dos Remedios C. et al.* Cardiac myosin-binding protein C mutations and hypertrophic cardiomyopathy: haploinsufficiency, deranged phosphorylation, and cardiomyocyte dysfunction // *Circulation.* 2009. V. 119. № 11. P. 1473–1483.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.838672>
27. *Marston S., Copeland O'N., Jacques A. et al.* Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency // *Circ. Res.* 2009. V. 105. № 3. P. 219–222.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.202440>
28. *O'Leary T.S., Snyder J., Sadayappan S. et al.* MYBPC3 truncation mutations enhance actomyosin contractile mechanics in human hypertrophic cardiomyopathy // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2019. V. 127. P. 165–173.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.12.003>
29. *Predmore J.M., Wang P., Davis F. et al.* Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies // *Circulation.* 2010. V. 121. № 8. P. 997–1004.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.904557>
30. *Suay-Corredera G., Alegre-Cebollada J.* The mechanics of the heart: zooming in on hypertrophic cardiomyopathy and cMyBP-C // *FEBS Lett.* 2022. V. 596. № 6. P. 703–746.  
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.14301>

## Novel Frameshift Variant of the *MYBPC3* Gene Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy Significantly Decreases the Level of This Gene's Transcript in the Myocardium

I. S. Kiselev<sup>1</sup>, M. S. Kozin<sup>1, \*</sup>, N. M. Baulina<sup>1</sup>, M. B. Sharipova<sup>2</sup>, A. S. Zotov<sup>1</sup>, E. A. Stepanova<sup>3</sup>, E. V. Kurilina<sup>1</sup>, G. Zh. Abdullaeva<sup>4</sup>, D. A. Zateyshchikov<sup>1, 5</sup>, O. O. Favorova<sup>1</sup>, O. S. Chumakova<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup>Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, 121552 Russia

<sup>2</sup>Regional Multidisciplinary Medical Center, Bukhara, 200100 Uzbekistan

<sup>3</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993 Russia

<sup>4</sup>Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Cardiology, Tashkent, 100052 Uzbekistan

<sup>5</sup>City Clinical Hospital #17, Moscow, 119620 Russia

\*e-mail: kozinmax1992@gmail.com

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common inherited heart disease with a prevalence of 1 : 200–1 : 500 in the general population. The majority of HCM-linked pathogenic (or likely pathogenic) variants is located in eight genes encoding proteins of sarcomere, the main contractile unit of cardiomyocytes; one of these genes, *MYBPC3*, is the most commonly affected and usually associated with the more benign clinical course of the disease compared to other HCM-related genes. Here, we describe a novel frame shift variant NM\_000256.3:c.2781\_2782insCACA of the *MYBPC3* gene that causes familial HCM in the heterozygous state. The proband had a progressive heart failure despite the surgical removal of left ventricular tract obstruction. Evaluation of levels of transcripts produced from the mutant allele and wild-type allele of the *MYBPC3* gene in proband myocardial tissue and comparison of their total levels with ones in the control samples from patients without HCM showed a significant allele-specific reduction of mutant transcript levels. Our results expand the spectrum of known genetic variants with a proven role in the development of HCM.

**Keywords:** hypertrophic cardiomyopathy; *MYBPC3*; novel variant; genetic testing, expression analysis.

## АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ CRISPR/CAS9-РЕДАКТИРОВАНИЯ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ГЕНА *GEX2* В ПРОТОПЛАСТАХ КУКУРУЗЫ

© 2024 г. Е. М. Моисеева<sup>1</sup>, В. В. Фадеев<sup>1,2</sup>, Ю. В. Фадеева<sup>1,2</sup>, Ю. С. Гусев<sup>1,2</sup>, М. И. Чумаков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр “Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

<sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия

\*e-mail: chumakov\_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 24.11.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 29.12.2023 г.

Белок *GEX2* экспрессируется в мембранах гамет кукурузы и необходим при оплодотворении на этапе контакта (адгезии) мембран гамет. Нокаутирование этого гена, предположительно, может привести к нарушению оплодотворения и, как следствие, образованию матроклиных гаплоидных зародышей кукурузы. Целью исследования является анализ эффективности редактирования гена *GEX2* после ПЭГ-опосредованной трансфекции протопластов кукурузы рибонуклеопротеидными (РНП) комплексами с разными гидРНК. Впервые созданы конструкции для CRISPR/Cas9-редактирования гена *GEX2* кукурузы, эффективность которых доказана на протопластах и достигает 10,7%, в зависимости от подобранной гидРНК, соотношения и количества компонентов в РНП-комплексах.

**Ключевые слова:** *Zea mays*, гаметы, протопласты, CRISPR-Cas9-редактирование, гидРНК.

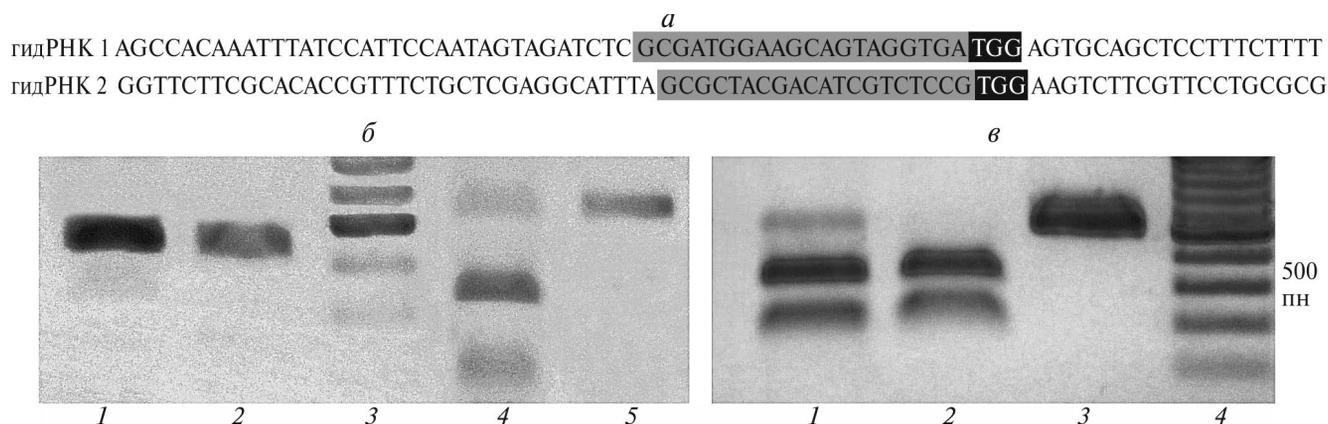
**DOI:** 10.31857/S0016675824060114 **EDN:** BXNSRT

Кукуруза (*Zea mays* L.) – одна из наиболее распространенных сельскохозяйственных культур, производство которой в мире во втором десятилетии XXI века выросло более чем в полтора раза по сравнению с 2010 г., а в России с 1985 по 2018 гг. сбор зерна увеличился в девять раз [1]. Исследование явления гиногенеза у кукурузы представляет научный и практический интерес в связи с разработкой эффективных методов получения гаплоидов, необходимых в частности для ускоренного создания гомозиготных линий. У современных сортов кукурузы гиногенез встречается крайне редко (0.01–0.1%) [2, 3]. Обычно для селекции гомозиготных линий кукурузы, необходимо около шести–восемь поколений, для более быстрого их получения используют в качестве опылителей так называемые линии-гаплоиндукторы, при опылении пылью которых в потомстве возникают гаплоидные растения в десятки, сотни раз чаще, по сравнению с нормой.

При двойном оплодотворении у покрытосеменных растений из оплодотворенной яйцеклетки развивается диплоидный зародыш. Центральная клетка с двумя полярными ядрами (2n) в результате

слияния со вторым спермием (1n) образует триплоидный эндосперм (3n). При нарушении оплодотворения яйцеклетки у покрытосеменных растений может формироваться гаплоидный зародыш (1n). Одним из механизмов его образования является гиногенез, при котором после проникновения спермия в яйцеклетку их ядра не сливаются, и в последующем развитии участвует только ядро яйцеклетки [4].

За последние 5–7 лет были открыты несколько генов кукурузы, экспрессия которых приводит к развитию в потомстве матроклиных гаплоидов [4]. В 2016 г. был описан ген *CENH3*, влияющий на расхождение хромосом [5]. Нарушения расхождения хромосом в анафазе митоза могут приводить к полной элиминации хромосом отцовского родителя и образованию гаплоидных зародышей. В 2017 г. тремя независимыми научными группами у линии кукурузы Stock 6 был открыт ген гиногенеза, получивший разные названия – *MATRILINEAL (MTL)* [6], *NOT LIKE DAD (NLD)* [7], *PLA1* [8]. Мы предположили [9], что мутация по гену кукурузы *MTL/NLD/PLA1*, кодирующему фермент фосфолипазу, может привести к изменениям в составе



**Рис. 1.** Оценка эффективности работы РНП-комплексов *in vitro* и в протопластах кукурузы. *a* – нуклеотидные последовательности участков гена *GEX2*, содержащие протоспейсеры для гидРНК 1, 2; целевые сайты для гидРНК выделены серым цветом, РАМ-последовательности – черным. *б* – электрофорез ПЦР-продуктов с фрагмента гена *GEX2* после обработки РНП-комплексами *in vitro*; дорожки: 1 – ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 1 после инкубации с РНП-комплексом; 2 – ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 1 (без обработки); 3 – маркер молекулярного веса ДНК; 4 – ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 2 после инкубации с РНП-комплексом; 5 – ПЦР-продукт с целевым локусом для гидРНК 2 (без обработки). *в* – электрофорез ПЦР-продуктов с целевым локусом для гидРНК 2. Дорожки: 1 – ПЦР-продукт с фрагмента гена *GEX2*, полученный с ДНК протопластов кукурузы после трансформации с РНП-комплексами (45 мг нуклеазы/15 мг гидРНК) и обработанный рестриктазой *BstMAI* (ожидаемые размеры полос после гидролиза – 324 и 183 пн); 2 – ПЦР-продукт с фрагмента гена *GEX2*, полученный с ДНК листа кукурузы и обработанный *BstMAI*; 3 – ПЦР-продукт с фрагмента гена *GEX2* без обработки *BstMAI* (507 пн, контроль); 4 – маркер молекулярного веса ДНК, шаг 100 пн.

липидов мембран и, как следствие – к нарушению способности мембраны спермия к взаимодействию и слиянию с мембраной яйцеклетки. Следуя этой логике, мутации, приводящие к нарушению взаимодействия и слияния мембраны спермия с мембраной яйцеклетки, могут привести к нарушению оплодотворения.

При взаимодействии гамет у растений на этапе контакта (адгезии) мембран необходим белок *GEX2* (*GAMETE EXPRESSED 2*) [10, 11], а на этапе слияния мембран – белок *HAP2/GCS1* [12]. В 2019 г. доказано, что ген *DMP9*, специфически экспрессирующийся в мембранах женской и мужской гамет растений и регулирующий их контакт [13], контролирует также гаплоиндукцию у кукурузы [14].

Эффективный перенос CRISPR-конструкций в клетки растения с целью редактирования генома, их сохранность и экспрессия являются актуальными проблемами современной биологии, в частности, в отношении доставки целевых конструкций. Для эффективного редактирования генома растений применяются различные методы доставки, такие как агробактериальная трансформация, библистическая трансформация, метод погружения цветочных почек, ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов, электропорация [15–17]. Существенные трудности возникают при трансформации однодольных растений с низкой регенерационной способностью.

Редактирование геномов растений с введением чужеродной ДНК в клетки вызывает проблемы, связанные с законодательным запретом коммерческого выращивания генетически модифицированных растений в России [18]. Важным преимуществом доставки компонентов CRISPR-системы в клетки в виде комплекса рибонуклеопротеидов (РНП) является возможность редактирования генов без интеграции в геном чужеродной информации [19–22]. РНП-комплексы действуют быстрее, чем генетические конструкции на основе векторов, поскольку комплекс сразу активен в клетке, не требуя внутриклеточной транскрипции и трансляции. Также необходимо отметить, что при использовании РНП-комплексов мутации вне зоны мишени либо вообще отсутствуют [23], либо их частота оказывается существенно ниже [19, 21].

Существуют различные методы доставки комплексов белков с нуклеиновыми кислотами в растительный геном с эффективностью, позволяющей регулировать различные клеточные процессы [24]. Основным препятствием на пути доставки генетического материала в растительные клетки является клеточная стенка, поэтому введение ДНК в клетки растений, лишенные клеточной стенки (протопласты), значительно повышает эффективность трансформации. Показано, что протопласты кукурузы остаются жизнеспособными через несколько суток после трансфекции, что делает возможным дальнейшее культивирование растительных тканей

[25]. Трансформация с использованием ПЭГ представляет собой наиболее часто используемый метод трансформации протопластов, применимый к клеткам различных растений.

Цель исследования — анализ эффективности редактирования гена *GEX2* после ПЭГ-опосредованной трансфекции протопластов кукурузы РНП-комплексами с разными гидРНК.

Материалом для исследования служили листья кукурузы линии Коричневый маркер (КМ), созданной С. Чейзом [26]. Протопласты выделяли из клеток мезофилла листа кукурузы в два этапа по методике, описанной в работе [27], с модификациями [28]. Подсчет количества протопластов проводили в камере Горяева при увеличении объектива 20× на микроскопе Leica DM 2500 (США).

Последовательности протоспейсеров для направляющей (гид) РНК к гену *GEX2* (GenBank accession no. MW195549.1, KMLine), определенные с помощью ресурса E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html>) или CHOP-CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), приведены на рис. 1, а. ГидРНК синтезировали в двух вариантах: двухкомпонентную гидРНК, состоящую из CRISPR РНК (crRNA) и транскрибирующей РНК (tracrRNA), и единую направляющую РНК (singleguideRNA, sgRNA).

ГидРНК 1 со спейсером GCGATGGAAGCAGTAGGTGA (Chr2: 187666031–187666050) была синтезирована компанией «Синтол» (Россия) в составе РНК-олигонуклеотидов crRNA – GCGAUGGAAGCAGUAGGUGAGUUU UAGAGCUAUGCUGUUUUUG и tracrRNA – GGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAUUUUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG CACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU. Последовательности РНК-олигонуклеотидов были определены как описано в работе [29].

ГидРНК 2 со спейсером GCGCTACGACATCGTCTCCG, 2:188130318) была получена в виде единой направляющей РНК (GC GCUACGACAUCGUCUCCGGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAUUUUUAAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUUU) с использованием набора для проведения T7-транскрипции *in vitro* (Биолабмикс, Россия). ДНК-матрицу для гидРНК 2 получали ПЦР-амплификацией синтезированных олигонуклеотидов (Синтол, Россия) с использованием высокоточной полимеразы Tersus (Евроген, Россия). Последовательности ДНК-олигонуклеотидов определяли с использованием ресурса (<https://sgrna.neb.com/#!/sgrna>).

Для проверки специфической активности (целевого расщепления) *in vitro* 10 мкл реакционной смеси, содержащей 200 нг ПЦР-амплифицированного целевого фрагмента гена *GEX2* кукурузы, 400

нМ специфической гидРНК и 400 нМ Cas9-NLS (Биолабмикс, Россия) инкубировали в стандартном буфере для проведения реакции в течение 1 ч. при 37°C. Комплекс Cas9/гидРНК 1 должен расщеплять продукт ПЦР (407 пн) с образованием двух фрагментов – 300 и 107 пн, Cas9/гидРНК 2 должен расщеплять продукт ПЦР (507 пн) с образованием фрагментов – 324 и 183 пн. В экспериментах *in vitro* РНП-комплекс с гидРНК 1 продемонстрировал очень низкую активность (рис. 1, б, дорожка 1), тогда как РНП-комплекс с гидРНК 2 оказался способен к расщеплению ПЦР-продукта, содержащего целевой локус (рис. 1, б).

Для приготовления 50 мкл РНП-комплексов для трансфекции протопластов использовали 7,5–15 мкг гидРНК и 22,5–45 мкг нуклеазы Cas9 (Биолабмикс, Россия). После 15-минутной инкубации при комнатной температуре РНП-комплексы смешивали с 50 мкл суспензии протопластов кукурузы (1–6 × 10<sup>5</sup> кл/мл), а затем добавляли 220 мкл 40% раствора ПЭГ (40% ПЭГ-4000, 0,6 М маннит, 0,1 М CaCl<sub>2</sub>) и инкубировали смесь 40 мин. при 25°C в темноте [30]. Далее к раствору добавляли 850 мкл раствора W5 [31], центрифугировали при 100 g 2 мин. ресуспендировали осадок в 500 мкл раствора W1 [31] и инкубировали при 25°C в темноте. Через сутки протопласты собирали центрифугированием при 100 g 2 мин, выделяли ДНК набором “ДНК-экстран-3” (“Синтол”, Россия) или с использованием додецилсульфата натрия [32]. Редактирование определяли по гидролизу специфическими эндонуклеазами рестрикции ПЦР-фрагментов целевых районов гена *GEX2* кукурузы [33]. Сайты узнавания рестриктаз *Asu*НPI или *Bst*МАI (СибЭнзайм, Россия) находились в области 17–18 нуклеотидов подобранной мишени (3 пн от РАМ-последовательности) для гидРНК 1 и 2. Целевой участок гена *GEX2*, содержащий протоспейсер, амплифицировали при помощи ПЦР. ПЦР-продукты получали с использованием праймеров *Gex2*-RNA1-F (TCGTTTCCCGTCCTACTCCT)/*Gex2*-RNA1-R (ACGAGTGCACAGTGTTGGAA), *Gex2*-RNA2-F (GGACTTCTTCCCTGCGATTGA) / *Gex2*-RNA2-R (GGCAAGGACCTGGTGTТАСА) и высокоточной полимеразы Tersus (Евроген, Россия). Предварительно очищенные (набор для очистки ДНК CleanUpMini (Евроген, Россия)) продукты ПЦР (60 нг) инкубировали 4 ч с эндонуклеазой рестрикции *Asu*НPI (гидРНК 1) или *Bst*МАI (гидРНК 2). Электрофорез продуктов рестрикции проводили в 2%-ном агарозном геле, анализ плотности свечения полос ДНК проводили с помощью программы ImageJ [34], используя формулу для расчета процента эффективности трансформации и редактирования на основе процентного отношения остаточных нерасщепленных фрагментов ПЦР к общему количеству продуктов ПЦР [35].

Нам не удалось зафиксировать редактирование гена *GEX2* в протопластах кукурузы в экспериментах с комплексами Cas9/гидРНК 1. В экспериментах с комплексами Cas9/гидРНК 2 эффективное редактирование было достигнуто только при использовании 45 мкг нуклеазы и 15 мкг гидРНК 2 (рис. 1, в), при соотношении 22,5 мкг нуклеазы и 7,5 мкг гидРНК редактирование не было зарегистрировано (данные не показаны).

Как видно из рис. 1, в часть ПЦР-продукта фрагмента гена *GEX2* осталась негидролизованной специфической эндонуклеазой рестрикции BstMAI (дорожка 1, верхняя полоса 507 пн), в отличие от полностью гидролизованного ПЦР-продукта в контроле (дорожка 2). Ампликоны с мутантными последовательностями устойчивы к расщеплению BstMAI, поскольку включают сайт узнавания рестрикционного фермента, который нарушен мутацией, индуцированной CRISPR/Cas9. Оценка плотности свечения полос с помощью программы ImageJ в двух независимых экспериментах показала, что на долю свечения верхней полосы (507 пн) приходится 6,5 и 10,7% всего свечения ПЦР-продукта. То есть в двух независимых экспериментах, с использованием 45 мкг нуклеазы Cas9 и 15 мкг гидРНК 2 эффективность редактирования гена *GEX2* составила 6,5 и 10,7%. Анализ литературных данных показал, что CRISPR-Cas9-редактирование протопластов кукурузы с подобранными гидРНК к гену инозитолфосфаткиназе дает эффективность от 0,85 до 5,85% [35]. В наших экспериментах эффективность трансформации и редактирования протопластов зависела от используемой гидРНК, соотношения и количества компонентов в РНП-комплексе.

Таким образом, можно количественно оценивать эффективности CRISPR/Cas9-редактирования генома протопластов кукурузы РНП-комплексами с разными гидРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МК-4527.2022.1.4) и Программы фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2021-2023 годы (№ 121031700141-7).

Авторы признательны О.В. Гуторовой за предоставленные семена кукурузы. Авторы признательны рецензентам за конструктивные замечания, улучшившие качество статьи.

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. Чумаков М.И., Гусев Ю.С., Богатырева Н.В., Соколов А.Ю. Оценка рисков распространения генетически модифицированной кукурузы с пылью при выращивании с нетрансформированными сортами (обзор) // С-хоз. биология. 2019. Т. 54. № 3. С. 426–445.  
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.426rus>
2. Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and its component single cross hybrids and inbred lines // Genetics. 1949. V. 34. № 4. P. 384–392.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795422040044>
3. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // Am. Naturalist. 1959. V. 93. № 873. P. 381–382.  
<https://doi.org/10.1086/282098>
4. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль гиногенеза у кукурузы (обзор) // Генетика. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795422040044>
5. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 414.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>
6. Kelliher T., Starr D., Richbourg L. et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction // Nature. 2017. V. 542. P. 105–109.  
<https://doi.org/10.1038/nature20827>
7. Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.B. et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // EMBO J. 2017.  
<https://doi.org/10.15252/embj.201796603>
8. Liu C., Li X., Meng D. et al. A 4-bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase a gene rates haploid induction in maize // Mol. Plant. 2017. V. 10. P. 520–522.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
9. Чумаков М.И. Матроклинная гаплоидия и взаимодействие гамет у кукурузы (обзор) // Генетика. 2018. Т. 54 № 10. С. 1120–1124.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795418100058>
10. Mori H., Kuroiwa T., Kranz E., Scholten S. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization // Nat. Cell Biol. 2006. V. 8. P. 64–71.  
<https://doi.org/10.1038/ncb1345>
11. Besser V.K., Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D. Arabidopsis HAP2(GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization // Development. 2006. V. 133. P. 4761–4769.  
<https://doi.org/10.1242/dev.02683>
12. Mori T., Igawa T., Tamiya G. et al. Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in Arabidopsis // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 170–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.030>

13. *Takahashi T., Mori T., Ueda K. et al.* The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants // *Development*. 2018. V. 45. dev170076. doi:10.1242/dev.170076
14. *Zhong Y., Liu C., Qi X. et al.* Mutation of ZmDMP enhances haploid induction in maize // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>
15. *Paszowski J., Baur M., Bogucki A., Potrykus I.* Gene targeting in plants // *The EMBO J.* 1988. V. 7. № 13. P. 4021–4026. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03295.x>
16. *Banakar R., Eggenberger A.L., Lee K. et al.* High-frequency random DNA insertions upon co-delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and selectable marker plasmid in rice // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 19902. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55681-y>
17. *Sandhya D., Jogam P., Allini V.R. et al.* The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plant // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2020. V. 18. P. 25. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00036-8>
18. *Богатырева Н.В., Соколов А.Ю., Мусеева Е.М. и др.* Правовое положение растений, полученных с использованием технологии редактирования генома: перспективы для России // *Экологическая генетика*. 2021. Т. 19. № 1. С. 89–101. <https://doi.org/10.17816/ecogen42532>
19. *Cho S.W., Lee J., Carroll D. et al.* Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9–sgRNA ribonucleoproteins // *Genetics*. 2013. V. 195. P. 1177–1180. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.155853>
20. *Woo J.W., Kim J., Kwon S. et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins // *Nat. Biotechnology*. 2015. V. 33. № 11. P. 1162–1164. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>
21. *Liang Z., Chen K., Li T. et al.* Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat. Com.* 2017. V. 8. P. 14261. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
22. *De Witt M.A., Corn J.E., Carroll D.* Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein // *Methods*. 2017. V. 121–122. P. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.04.003>
23. *Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B. et al.* Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat. Com.* 2016. V. 7. P. 13274. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
24. *Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В. и др.* Доставка CRISPR/CAS-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов // *Физиол. растений*. 2019. Т. 66. № 5. С. 339–353. <https://doi.org/10.1134/S0015330319050117>
25. *Kanchiswamy C.N.* DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1469–1474. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1982-2>
26. *Chase S.S.* Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.) // *The Bot. Review*. 1969. V. 35. № 2. P. 117–168. <https://doi.org/10.1007/BF02858912>
27. *Wolter F., Edelmann S., Kadri A., Scholten S.* Characterization of paired Cas9 nickases induced mutations in maize mesophyll protoplasts // *Maydica*. 2018. V. 62. № 2. P. 1–11.
28. *Красова Ю.В., Фадеев В.В., Мусеева Е.М. и др.* Оптимизация методики получения протопластов кукурузы и их нативность после электропорации // *Изв. Саратовского у-та. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2022. Т. 22. Вып. 4. С. 445–454. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-445-454>
29. *Mekler V., Minakhin L., Semenova E. et al.* Kinetics of the CRISPR–Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44. № 6. P. 2837–2845. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw138>
30. *Sant'Ana R.R.A., Caprestano C.A., Nodari R.O., Agapito-Tenfen S.Z.* PEG-delivered CRISPR–Cas9 ribonucleoproteins system for gene-editing screening of maize protoplasts // *Genes*. 2020. V. 11. P. 1029–1043. <https://doi.org/10.3390/genes11091029>
31. *Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J.* Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis // *Nature Protocols*. 2007. V. 2. № 7. P. 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
32. *Дрейнер Дж., Скотт Р., Армидж Ф. и др.* Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. М.: Мир, 1991. 408 с.
33. *Shan Q., Wang Y., Li J. et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR–Cas system // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 686–688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
34. *Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. P. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
35. *Sentmanat M.F., Peters S.T., Florian C.P. et al.* A survey of validation strategies for CRISPR–Cas9 editing // *Sci. Reports*. 2018. V. 8. P. 888–895. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>

## Analysis of the Effectiveness of Crispr-Editing of the *GEX2* Gene by Ribonucleoprotein Complexes in Maize Protoplasts

E. M. Moiseeva<sup>1</sup>, V. V. Fadeev<sup>1, 2</sup>, Y. V. Fadeeva<sup>1, 2</sup>, Y. S. Gusev<sup>1, 2</sup>, M. I. Chumakov<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal Research Center,*

<sup>2</sup>*Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

<sup>3</sup>*Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, 410012 Russia*

*\*e-mail: chumakov\_m@ibppm.ru*

The *GEX2* protein is expressed in the maize gamete membranes and necessary for gamete membranes contact (adhesion). Knockout of *GEX2* gene, presumably, can lead to impaired fertilization and, as a result, to the haploid embryo formation. The aim of the study is to analyze the efficiency of CRISPR/Cas9 editing of the *GEX2* gene after PEG-mediated transfection of maize protoplasts by ribonucleoprotein (RNP) complexes with different sgRNA. For the first time, the RNP complexes with different sgRNA to the *GEX2* gene have been created. The effectiveness of CRISPR/Cas9 editing of the *GEX2* gene have been proven on protoplasts and reaches 10.7%, depending on the sgRNA, level and thesgRNA:Cas9 ratio in the RNP complex.

**Keywords:** *Zea mays*, gametes, protoplasts, CRISPR/Cas9 editing, sgRNA.