

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 10

Октябрь 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 10, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Иммуногенетические факторы в патогенезе шизофрении

*М. Ю. Плотникова, С. С. Кунижева,
Е. В. Рождественских, Т. В. Андреева* 1103

Генетический ресурс пырея *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey
в селекционном улучшении пшеницы

Т. В. Коростылева, А. Н. Шиян, Т. И. Одинцова 1112

Генетические факторы рефлекторных эпилепсий

*Н. А. Дудко, С. С. Кунижева, Т. В. Андреева,
И. Ю. Адрианова, Е. И. Розаев* 1120

Генетика растений

Молекулярное маркирование в селекции капусты белокочанной
(*Brassica oleracea* L.) на устойчивость к фузариозному увяданию

*Е. В. Дубина, Ю. А. Макуха, А. М. Артемьева, Д. А. Фатеев,
С. В. Гаркуша, О. Л. Горун, С. А. Лесняк* 1134

Генетика животных

Филогения рода *Eleginus* (Gadidae) по данным анализа изменчивости
микросателлитных локусов и фрагмента *COI* мтДНК

*А. Н. Строганов, Е. В. Пономарева, М. В. Пономарева,
Е. А. Шубина, К. А. Жукова, А. А. Смирнов,
Т. А. Ракицкая, М. В. Ракитина* 1142

ДНК-идентификация паразитических копепод *Salmincola* (Copepoda,
Siphonostomatoida, Lernaeopodidae): изменчивость и скорость
эволюции митохондриального гена цитохром с-оксидазы I

С. В. Шедько, М. Б. Шедько, И. Л. Мирошниченко, Г. А. Немкова 1154

Генетика человека

Исследование ассоциации полиморфных вариантов rs2295080
и rs1883965 гена *MTOR* с развитием и течением саркоидоза легких

И. Е. Малышева, Л. В. Топчиева, Э. Л. Тихонович 1165

Влияние хронического радиационного воздействия на экспрессию микроРНК человека

М. А. Янишевская, Е. А. Блинова, А. В. Аклеев 1171

Полногеномное ассоциативное исследование: анализ ассоциации параноидной
шизофрении с полиморфными локусами, локализованными
в хромосомных областях 4p15.2 и 20q13.31

А. Э. Гареева 1179

Contents

Vol. 59, No. 10, 2023

Reviews and Theoretical Articles

Immunogenetic Factors in the Pathogenesis of Schizophrenia

*M. Yu. Plotnikova, S. S. Kunizheva,
E. V. Rozhdestvenskikh, and T. V. Andreeva*

1103

The Genetic Resource of *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey
in Breeding Improvement of Wheat

T. V. Korostyleva, A. N. Shiyan, and T. I. Odintsova

1112

Genetic Factors of Reflex Epilepsies

*N. A. Dudko, S. S. Kunizheva, T. V. Andreeva,
I. Yu. Adrianova, and E. I. Rogaev*

1120

Plant Genetics

Molecular Marking in *Brassica oleracea* L. Breeding for Resistance to Fusarium Wilt

*E. V. Dubina, Yu. A. Makukha, A. M. Artem'eva, D. A. Fateev,
S. V. Garkusha, O. L. Gorun, and S. A. Lesnyak*

1134

Animal Genetics

Phylogeny of the Genus *Eleginus* (Gadidae) according to the Analysis
of the Variability of Microsatellite Locus and mtDNA *COI* Fragment

*A. N. Stroganov, E. V. Ponomareva, M. V. Ponomareva, E. A. Shubina,
K. A. Zhukova, A. A. Smirnov, T. A. Rakitskaya, and M. V. Rakitina*

1142

DNA Identification of Parasitic Copepods *Salmincola* (Copepoda, Siphonostomatoida,
Lernaeopodidae): Variability and Rate of Evolution
of the Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I Gene

S. V. Shedko, M. B. Shedko, I. L. Miroshnichenko, and G. A. Nemkova

1154

Human Genetics

Study of the Association of Polymorphic Variants rs2295080 and rs1883965
of the *MTOR* Gene with the Development of Pulmonary Sarcoidosis

I. E. Malysheva, L. V. Topchieva, and E. L. Tikhonovich

1165

Effect of Chronic Radiation Exposure on Human microRNA Expression

M. A. Yanishevskaya, E. A. Blinova, and A. V. Akleyev

1171

Genome-Wide Association Study: Analysis of Association of Polymorphic Loci
in 4p15.2 and 20q13.31 Regions with Paranoid Schizophrenia

A. E. Gareeva

1179

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 57.088.575

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ШИЗОФРЕНИИ

© 2023 г. М. Ю. Плотникова^{1, 2, 3, *}, С. С. Кунижева^{1, 2, 3},
Е. В. Рождественских², Т. В. Андреева^{1, 2, 3}

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

²Центр генетики и наук о жизни, Университет “Сириус”, Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: plotnikova.m.u.1996@gmail.com

Поступила в редакцию 27.01.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 10.06.2023 г.

Предрасположенность человека к нейropsychическим заболеваниям, таким как шизофрения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и другим нейропатологиям связана как с генетическими факторами, так и с факторами внешней среды. В настоящее время одним из перспективных направлений в области молекулярных нейронаук является исследование роли иммуногенетических механизмов при различных типах патологических процессов в мозге. В данном обзоре освещаются последние результаты исследований в области иммуногенетики шизофрении, а также ряда других нейropsychических патологий, в патогенезе которых подтверждена роль иммунного компонента. В рамках данного обзора рассмотрена роль генов главного комплекса гистосовместимости в патогенезе шизофрении, оценка изменений иммунного репертуара Т-клеточных и В-клеточных рецепторов при нейровоспалении. Также представлены результаты изучения генов иммуноглобулинов, изменение работы которых связано с развитием нейropsychических патологий.

Ключевые слова: иммуногенетика, шизофрения, Т-клеточные рецепторы, В-клеточные рецепторы, полногеномное секвенирование, главный комплекс гистосовместимости, нейровоспаление, иммуноглобулины.

DOI: 10.31857/S0016675823100107, EDN: UBASAA

Нейropsychические заболевания затрагивают около одного миллиарда человек во всем мире, включая людей всех возрастных групп и национальностей, проживающих в различных странах и имеющих разный социально-экономический статус [1]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние десятилетия в лечении многих нейropsychических патологий, все еще отсутствует полное понимание механизмов патогенеза этих заболеваний, в результате чего репертуар доступных методов лечения еще далек от совершенства. Недавние достижения в области геномных исследований заложили основу для понимания роли генетических механизмов и рисков, связанных с развитием и патогенезом неврологических и нейropsychических заболеваний, что открывает новые перспективы профилактики и прогноза течения заболеваний, а также новые терапевтические возможности. Например, известно, что гены, кодирующие антиген-презентирующие молекулы главного комплекса гистосовместимости человека, вносят значительный вклад в генетический риск развития таких нейропатологий как шизофрения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона,

рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и другие [2]. Тем не менее роль генетических факторов развития большинства нейropsychических заболеваний, таких как шизофрения, остается недостаточно обоснованной из-за гетерогенной и многофакторной природы этих патологий.

Шизофрения является мультифакториальным психическим расстройством с наследуемостью 73–90% согласно данным The International Schizophrenia Consortium [3], поражающим примерно 1% населения. Она относится к одним из самых тяжелых психических расстройств, приводящих к сокращению ожидаемой продолжительностью жизни приблизительно на 15 лет [4, 5].

Несмотря на уже существующие методы лечения как негативных, так и позитивных симптомов шизофрении, направленных на нормализацию функционирования дофаминергической и глутаматергической систем организма, до сих пор не разработано эффективных методов предотвращения и полноценного лечения такого заболевания как шизофрения. Одной из важных задач на данный момент является поиск молекулярно-гене-

тических процессов, лежащих в основе развития данной болезни. К настоящему времени в геноме человека выявлено 287 локусов, ассоциированных с риском развития шизофрении [3, 6], в ряде случаев у пациентов были обнаружены случайные (спорадические) мутации, которые отсутствовали в геномах родителей [7]. Однако функциональные аллели, а также регуляторные механизмы и взаимодействия между аллельными вариантами во многих генах еще остаются неизвестными. При этом особый интерес представляет изучение иммуногенетических факторов шизофрении в связи с широкоизвестной на данный момент теорией нейровоспаления [8]. Накопленные эпидемиологические и клинические данные позволяют предположить, что иммунные нарушения присутствуют, по крайней мере, у части пациентов с шизофренией, что подтверждает вклад генов иммунной системы в развитие заболевания [8, 9].

РОЛЬ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Одним из ключевых открытий в исследовании шизофрении за последние десятилетия стало обнаружение воспалительных процессов в тканях мозга у пациентов, свидетельствующее о том, что нейровоспаление и иммунная дисфункция могут иметь большое значение в патогенезе шизофрении. Эти предположения подтверждаются повышенной частотой аутоиммунных заболеваний у пациентов [10]. Признаки нейровоспаления у больных шизофренией обычно обнаруживаются в связи с повышенной транскрипцией медиаторов воспаления в центральной нервной системе (ЦНС), избыточной активацией микроглии, угнетением активности глутаматных рецепторов, приводящими к уменьшению числа синапсов и апоптозу нейронов [11].

Нарушение иммунной регуляции при шизофрении были обнаружены в многочисленных исследованиях [12, 13], а метаанализ показал, что у пациентов с шизофренией обнаруживаются признаки вялотекущего периферического воспаления, сопровождающегося повышением уровня экспрессии мРНК нескольких провоспалительных цитокинов [14–16]. Результаты постмортальных исследований указывают на увеличение экспрессии многих провоспалительных генов, в том числе члена семейства *Serpin 3* (*SERPINA3*) и индуцируемого интерфероном трансмембранного белка (*IFITM*) в тканях мозга пациентов с шизофренией [17]. В постмортальных тканях мозга пациентов с шизофренией была выявлена повышенная активность микроглии [18] и увеличение экспрессии *HLA-DR* [17]. Исследования иммунного репертуара больных показали, что проактивная [19] или нарушенная [20] функция Т-клеток при воспали-

тельных и дегенеративных процессах является фактором риска развития патологии.

Проведенный в 2011 г. метаанализ показал значительные изменения иммуновоспалительных показателей при шизофрении у взрослых, а именно повышение уровня интерлейкинов (*IL*)-1 β , *IL*-6 и трансформирующего фактора роста- β (*TGF*- β) у больных с острым рецидивом по сравнению с контрольной группой [21]. Данные пациентов свидетельствуют об изменении уровня цитокинов типов *TH1* и *TH2*, слабо выраженном воспалении [22], а также активации микроглии и астроцитов [8, 9, 23, 24]. Позднее было показано, что увеличение уровня экспрессии провоспалительных генов (*TNF* α , *IL*1 β , *IL*6 и *IL*8) в тканях мозга пациентов на различных стадиях течения заболевания может быть связано с повышенной активностью ядерного фактора карра В (*NF*- κ B) [17].

Современные данные указывают на снижение экспрессии *CXCL8* и увеличение экспрессии *CCL2* в дорсолатеральной префронтальной коре у пациентов с шизофренией. Повышенная экспрессия *CCL2* может способствовать миграции лейкоцитов в ткани головного мозга и инициировать нейровоспаление. Кроме того известно, что активированная микроглия продуцирует *IL*-1 β , *IL*-6 и *TNF* α . Повышение уровня экспрессии *CCL2* в головном мозге может быть связано с увеличением экспрессии *IL*-1 β , *TNF* α и других цитокинов. На сегодняшний день недостаточно данных об экспрессии хемокинов в центральной нервной системе при шизофрении. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения характерных паттернов экспрессии хемокинов в других областях мозга [25].

В результате клинических исследований было показано, что направленное снижение воспалительных процессов у пациентов с шизофренией может иметь терапевтический эффект, независимо от причины воспаления [26]. В исследовании М. Cho и соавт. было выявлено, что противовоспалительные препараты снижают выраженность психических симптомов у пациентов с шизофренией [27]. Однако на данный момент, лишь для части пациентов с шизофренией существует эффективная терапия [26].

Появление технологий секвенирования нового поколения (*NGS*) открыло новые возможности в области изучения вариантов последовательностей рецепторов Т- и В-лимфоцитов, выделенных из крови, тканей печени и мозга, а также в области расшифровки генов главного комплекса гистосовместимости [28–30]. Существуют различные иммуногенетические базы данных, которые постоянно обновляются: *IPD-IMGT/HLA* [31], *VDJdbbrowser* [32], *ImmunoglobulinDatabase MDSAS* (<https://igd.mdsas.com/ig-database/>). В них также представлены клонотипы Т-клеточных

рецепторов и гаплотипов главного комплекса гистосовместимости у пациентов с шизофренией. Это позволяет эффективнее изучать вклад иммунного компонента при развитии шизофрении на разных стадиях заболевания, и открывает дополнительные возможности для изучения патогенеза шизофрении. Совокупность уже полученных данных о процессах развития нейровоспаления при шизофрении является важным заделом для выявления и изучения генетических механизмов, лежащих в основе данных иммунных процессов [33–36].

АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ HLA-КЛАСТЕРА С ШИЗОФРЕНИЕЙ

Многочисленные эпидемиологические, иммунологические и генетические исследования, проводимые с 1970-х гг., свидетельствуют о том, что главный комплекс гистосовместимости играет важную роль в развитии шизофрении [37–40]. Главный комплекс гистосовместимости (MHC — major histocompatibility complex) включает семейство поверхностных белков, которые регулируют адаптивную иммунную систему. Система человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA, human leukocyte antigens) представляет собой локус на хромосоме 6 человека, кодирующий белки, которые в большинстве случаев отвечают за регуляцию иммунновоспалительных процессов. Показано, что этот комплекс задействован при различных инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваниях, а также предполагается, что HLA-система принимает участие в формировании нервной системы и развитии нейропластичности через регуляцию микроглии и сокращения синапсов [41, 42]. Гены HLA-системы (HLA класса I и II) высоко полиморфны, на сегодняшний день в базе данных IMGT/HLA зарегистрировано более 26000 аллелей [43]. Высокополиморфная структура локуса HLA представляет особый интерес при изучении нейropsychических заболеваний, таких как шизофрения, расстройство аутистического спектра и биполярное расстройство [42, 44, 45].

На сегодняшний день результаты полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) подтверждают связь генов HLA с шизофренией. В 2009 г. был опубликован метаанализ трех исследований GWAS, в результате которого были подтверждены генетические ассоциации локусов HLA с шизофренией (показана ассоциация заболевания с гаплотипами *HLA-A*0101*, *HLA-B*0801*, *HLA-C*0701*, *HLA-DRB*0301*, *HLA-DQB*0201*) [46–48]. В последующих работах была показана протективная роль аллелей *HLA-A*01*, *B*08* и *DRB1*03* при развитии шизофрении [49]. Все эти HLA-гаплотипы происходят от так называемого предкового “аутоиммунного” гаплотипа 8.1 (8.1AH)

(*A*01~B*08~Cw*07~DRB1*03~DQB1*02*) [50]. Наиболее достоверная ассоциация была связана с гаплотипом *HLA-C*01:02*. Гаплотипы *HLA-DRB1*03:01* и *B*08:01* являются протективными. В работе В. Vian с соавт. были определены генетические варианты в HLA и KIR для выборки, состоящей из 30000 человек, принадлежащих европейской популяции. Было показано, что гаплотипы *HLA-B*08:01*, *HLA-DRB1*03:01* и *HLA-DQB1*02* связаны с шизофренией и депрессией, а также выявлено, что количество копий гена *KIR* не связано с фенотипами заболеваний [51, 52]. При исследовании профилей цитокинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN γ , TNF α), а также генов *HLA-DRB1*, *IL1RN*, *HP2* у пациентов с шизофренией и ревматоидным артритом были подтверждены ассоциации обоих заболеваний со специфическими аллелями *HLA-DRB1* и выявлены иммунологические подгруппы пациентов с шизофренией с различными цитокиновыми сигнатурами [53].

Также известно, что внутриутробные инфекции, которые могут быть причиной нейровоспаления в организме матери, повышают риск развития шизофрении у ребенка в связи с накоплением провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин 6 (IL-6). В работе V. Shivakumar наблюдалась пониженная экспрессия гена *IL6* в периферических мононуклеарах крови пациентов с шизофренией ($p = 0.004$) по сравнению с контролем, и было показано, что гомозиготный делеционный вариант *HLA-G* у пациентов может ослаблять опосредованное IL-6 воспаление при шизофрении [54].

Также известно, что мутации генов, кодирующих компоненты системы комплемента (*C4A* и *C4B*), при шизофрении приводят к снижению количества синапсов и ветвистости отростков аксонов. В работе с применением комплексной методики анализа, включающей геномное секвенирование, анализ экспрессии генов и эксперименты с модельными животными, было показано, что риск развития шизофрении частично может быть связан с увеличением количества копий гена комплемента *C4A* с последующим *C4*-зависимым нейросинаптическим сокращением [51]. Оценивая количество копий каждого гена и наличие или отсутствие у человека модулирующей транскрипцию последовательности, авторы установили связь между мутациями в генах системы комплемента и количественным уровнем экспрессии генов *C4A* и *C4B* в головном мозге, а также клинической картиной шизофрении. Было показано, что оба гена человека (*C4A* и *C4B*) связаны с шизофренией, риск развития которой выше в случае определенных вариаций в геноме, увеличивающих экспрессию *C4A*. Также было показано, что у нокаутных мышей *C4* участвует в элиминации синапсов во время постнатального развития, что

может объяснить влияние генов системы комплимента на сокращение числа синапсов в мозге пациентов с шизофренией [51]. Дальнейшие исследования в этой области, в том числе расшифровка нуклеотидных последовательностей кластера генов *C4* могут помочь при анализе этой сложной для изучения области генома и ее роли в патогенезе шизофрении.

В работе J. Li с соавт. 2022 г. исследовали влияние распространенных вариантов из области xMHC (extended major histocompatibility complex) на терапию антипсихотическими препаратами пациентов с персистирующим психозом. Были выявлены эпистатические взаимодействия между генами *HLA-C* и *C4A*: носители минорного аллеля *G* полиморфизма rs204991 в интронной области вблизи *C4A/C4B*, ассоциированного с пониженным риском шизофрении и пониженной экспрессией *C4A*, лучше реагировали на антипсихотические препараты. Данные генетические варианты значительно изменяют экспрессию генов *C4A*, *HLA-C* и *BTN3A2* [55]. Кроме того, было показано, что протективная роль гаплотипа 8.1 АН связана с отсутствием в этом гаплотипе локуса *C4*. Этот гаплотип значительно реже встречается у пациентов с ювенильной формой шизофрении, а частота его встречаемости коррелирует с возрастом начала заболевания [50, 56]. Для пациентов с шизофренией, не имеющих HLA-гаплотипов 8.1 АН, характерна более тяжелая форма расстройства, характеризующаяся ранним началом заболевания и снижением плотности синапсов, что предположительно связывают с активным локусом *C4* [57]. Предполагают, что гаплотип 8.1 АН, ассоциированный со снижением экспрессии *C4*, может, с одной стороны, оказывать протективный эффект и давать “отсрочку” начала развития шизофрении. При этом, с другой стороны, он может усиливать более поздние провоспалительные и аутоиммунные процессы [50].

Таким образом, данные различных исследований в настоящее время подтверждают связь вариантов в локусе MHC и шизофренией [52]. Следует отметить, что главный комплекс гистосовместимости связан не только с шизофренией, но и с другими нейропсихическими заболеваниями (болезни Паркинсона [58, 59], Альцгеймера [60, 61], рассеянный склероз [62, 63], аутизм [64]).

ИЗМЕНЕНИЕ РЕПЕРТУАРА ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (Ig) И КЛОНОТИПОВ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

В ответ на нейровоспалительные процессы в организме происходят изменения иммунного репертуара Т-клеток иммунной системы (Т-лимфоцитов). Изменения Т-клеточного репертуара уже показаны для целого ряда заболеваний, включая

онкологические, аутоиммунные, нейропсихические патологии [30, 65, 66]. Система адаптивного иммунитета для защиты от всего спектра возможных антигенов продуцирует разнообразные случайные нуклеотидные последовательности, кодирующие клеточные рецепторы [67]. Как уже отмечалось выше, иммунологические исследования пациентов с шизофренией показали, что В-клетки и Т-клетки иммунной системы вовлечены в развитие нейровоспаления, которое связано с шизофренией [68, 69]. Данные клетки содержат на своей поверхности высокоспецифичные рецепторы: В-клеточные рецепторы (BCR) и Т-клеточные рецепторы (TCR).

В-клеточные рецепторы

На сегодняшний день известно, что изменения в генах иммуноглобулинов могут быть связаны с шизофренией. Предполагается, что определенные генотипы иммуноглобулинов GM могут быть связаны с патогенезом шизофрении. В некоторых работах было показано, что аллели GM участвуют в формировании иммунного ответа к цитомегаловирусу (CMV) и вирусу простого герпеса типа 1 (HSV1), которые могут быть связаны с когнитивными нарушениями при шизофрении [70, 71]. Риск шизофрении у пациентов с генотипом GM “3/3; 23-/23-” более чем в три раза выше по сравнению с индивидами, у которых этот генотип отсутствует. Была обнаружена связь между гомозиготностью по аллелю GM-17 и низкими показателями внимания и скорости обработки информации у пациентов с шизофренией. Эти результаты впервые показывают, что малоизученные до сих пор генотипы иммуноглобулинов GM и KM вносят вклад в величину межиндивидуальной вариативности когнитивных функций у больных шизофренией [72–75].

Среди инфекционных причин развития шизофрении важную роль отводят нейротропным инфекционным агентам, таким как *Toxoplasma gondii*. Так, было показано, что уровень сывороточных иммуноглобулинов G (IgG) к *T. gondii* был значительно ниже у пациентов с шизофренией по сравнению с контрольной группой, причиной чего может быть иммуносупрессивность антипсихотических препаратов [76]. В другой работе была показана связь генов, ассоциированных с шизофренией (например *GABBR2*, *CNTNAP2*, *NOS1*, *NPAS3*), с чувствительностью или иммунным ответом на заражение *T. gondii* [77]. Также у пациентов с шизофренией наблюдались значительные изменения уровня циркулирующих антител против антигенов, кодируемых ассоциированными с шизофренией генами. Повышенный уровень IgG у больных шизофренией по сравнению с контрольной группой показали пептидные антигены, полученные из DPYD, MAD1L1, ZNF804A, DRD2,

TRNK1 и MMP16 соответственно, а снижение уровня IgG показали антигены, полученные из TSNARE1, TCF4 и VRK2. Более того, показано, что циркулирующие анти-TRANK1 IgG, могут быть использованы как биомаркеры шизофрении [78].

Т-клеточные рецепторы

Использование масштабного параллельного секвенирования позволяет изучать широкий спектр параметров Т-клеточных рецепторов: разнообразие репертуаров, частоты использования сегментов TCR, кластерный анализ, длины гипервариабельных участков (*CDR3*), количество добавленных нуклеотидов и другие параметры аминокислот, входящих в регионы *CDR1*, *CDR2*, *CDR3*. Также появились новые подходы к моделированию разнообразия и динамики иммунного репертуара [79], которые могут помочь в понимании механизмов взаимодействия между клетками и формирования различных подтипов рецепторов Т-клеток. Такие данные необходимы при отслеживании прогрессирования заболевания, а также при дифференциации фенотипов шизофрении. Комплексный иммуно-биоинформационный анализ может изменить наше понимание нейропсихических заболеваний за счет открытия новых нейроиммунных путей, выявления доступных симптоматических и диагностических биомаркеров, а также за счет разработки иммунных методов лечения и профилактики этого хронического тяжелого полигенного заболевания путем освоения инженерии антител, дизайна вакцин и клеточной иммунотерапии [80], <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31685450/>.

Вклад иммунного репертуара Т-клеточных рецепторов в развитие шизофрении изучается в последние годы разными группами исследователей. Так, в результате анализа разнообразия области *CDR3* бета-цепи рецептора Т-клеток (*TRB*) в крови у пациентов с шизофренией были выявлены значимые отличия в распределении V-сегментов *TRB* у пациентов с шизофренией по сравнению с контрольной группой. В частности, сегмент *TRBV2* встречался со значительно более высокой частотой у пациентов с шизофренией, склонных к насилию, по сравнению с другими группами пациентов и контрольной группой [81].

В недавнем исследовании была показана возможность выделения подтипов шизофрении на основе профилей метилирования ДНК. Такое разделение соответствовало различиями в репертуарах TCR у пациентов, а также тяжести симптомов заболевания [82]. Полученные данные открывают новые перспективы в разработке персонализированных методов терапии шизофрении, основанных на параметрах индивидуальных молекулярных маркерах заболевания.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ИММУНОГЕНЕТИКИ ШИЗОФРЕНИИ

Микробиота кишечника также играет важную роль в формировании иммунного ответа и иммуннопатогенезе шизофрении, частично опосредуя регуляцию когнитивных и эмоциональных процессов [80]. Работы в этой сфере открывают новое направление в области персонализированной медицины для коррекции нарушений в иммунной системе пациентов с шизофренией.

Новая технология исследования единичных клеток (single cell) уже получила применение в изучении иммунных факторов шизофрении. Например в недавней работе [83] было проведено секвенирование РНК из единичных клеток на нестимулированных и стимулированных мураилдипептидом (иммуностропное лекарственное средство) мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) пациентов. Анализы *in vitro* показали, что предварительное лечение воспроизводит нарушенную иммунную функцию при шизофрении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что иммунная система играет существенную роль в развитии шизофрении. Это становится все более очевидным с появлением информации о роли главного комплекса гистосовместимости (МНС) и системы комплемента, а также роли нейровоспаления при шизофрении. Результаты крупномасштабных GWAS-исследований по идентификации кандидатных иммуногенетических вариантов, ассоциированных с шизофренией, демонстрируют, что область геномики иммунитета при шизофрении в настоящее время динамично развивается.

В данном обзоре были рассмотрены обнаруженные к настоящему времени ассоциации между полиморфизмами генов HLA-кластера и риском развития шизофрении, которые влияют на регуляцию механизмов как врожденного, так и адаптивного иммунитета в контексте психоза. Также были рассмотрены изменения в иммунном репертуаре Т-клеточных и В-клеточных рецепторов при развитии шизофрении. Однако подробные клеточные и молекулярные механизмы иммунной дисфункции при шизофрении все еще не ясны.

Крупномасштабные генетические исследования с использованием технологии NGS-секвенирования, а также метаанализ накопленных ранее данных, представляют собой мощный инструмент для выявления молекулярно-генетических механизмов иммунновоспалительных процессов при патогенезе шизофрении. Для дальнейшего подтверждения иммунной гипотезы шизофрении и определения конкретных иммунных генов/клеток/путей, вовлеченных в шизофрению, на наш

взгляд, необходима интеграция геномных методов исследования с клиническим, когнитивным и нейрофизиологическим фенотипированием пациентов. Прогресс таких исследований может помочь в открытии новых биомаркеров, а также определению подтипов заболеваний и разработке новых, в том числе персонализированных методов лечения при шизофрении.

Выражаем особую благодарность Рогаеву Евгению Ивановичу и Андреевой Татьяне Владимировне за плодотворные обсуждения, позволившие систематизировать данный обзор.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер гранта 19-75-30039).

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. Cottler L.B., Zunt J., Weiss B. et al. Building global capacity for brain and nervous system disorders research // *Nature*. 2015. V. 527. № 7578. P. S207–S213. <https://doi.org/10.1038/nature16037>
2. Misra M.K., Damotte V., Hollenbach J.A. The immunogenetics of neurological disease // *Immunology*. 2018. V. 153. № 4. P. 399–414. <https://doi.org/10.1111/imm.12869>
3. International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia // *Nature*. 2008. V. 455. № 7210. P. 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature07239>
4. Kato T. A renovation of psychiatry is needed // *World Psychiatry*. 2011. V. 10. № 3. P. 198–199. <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2011.tb00056.x>
5. Perälä J., Suvisaari J., Saarni S.I. et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar disorders in a general population // *Arch. Gen. Psychiatry*. 2007. V. 64. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.1.19>
6. Trubetskoy V., Pardiñas A.F., Qi T. et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature*. 2022. V. 604. № 7906. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
7. Xu B., Roos J.L., Dexheimer P. et al. Exome sequencing supports a de novo mutational paradigm for schizophrenia // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 9. P. 864–868. <https://doi.org/10.1038/ng.902>
8. Pouget J.G. The emerging immunogenetic architecture of schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 2018. V. 44. № 5. P. 993–1004. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby038>
9. Anderson G., Maes M. Schizophrenia: Linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2013. V. 42. P. 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.06.014>
10. Mikocziova I., Greiff V., Sollid L.M. Immunoglobulin germline gene variation and its impact on human disease // *Genes Immun.* 2021. V. 22. № 4. P. 205–217. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00145-5>
11. Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Ogurtsov D.P. et al. A role of the immune system in the pathogenesis of schizophrenia // *Zhurnal. Nevrolog. Psikiatr. im. S.S. Korsakova*. 2018. V. 118. № 12. <https://doi.org/10.17116/jnevro201811812172>
12. International Schizophrenia Consortium. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder // *Nature*. 2009. V. 460. № 7256. P. 748–752. <https://doi.org/10.1038/nature08185>
13. Bishop J.R., Zhang L., Lizano P. Inflammation subtypes and translating inflammation-related genetic findings in schizophrenia and related psychoses: A perspective on pathways for treatment stratification and novel therapies // *Harv. Rev. Psychiatry*. 2022. V. 30. № 1. P. 59–70. <https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000321>
14. Uptegrove R., Manzanares-Teson N., Barnes N.M. Cytokine function in medication-naïve first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis // *Schizophr. Res.* 2014. V. 155. № 1–3. P. 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.03.005>
15. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., Spuch C. et al. Cytokines dysregulation in schizophrenia: A systematic review of psychoneuroimmune relationship // *Schizophr. Res.* 2018. V. 197. P. 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.11.023>
16. Fernandes B.S., Steiner J., Bernstein H.-G. et al. C-reactive protein is increased in schizophrenia but is not altered by antipsychotics: Meta-analysis and implications // *Mol. Psychiatry*. 2016. V. 21. № 4. P. 554–564. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.87>
17. Ermakov E.A., Melamud M.M., Buneva V.N., Ivanova S.A. Immune system abnormalities in schizophrenia: an integrative view and translational perspectives // *Front. Psychiatry*. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.880568>
18. Trépanier M.O., Hopperton K.E., Mizrahi R. et al. Post-mortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review // *Mol. Psychiatry*. 2016. V. 21. № 8. P. 1009–1026. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.90>
19. Gelderblom M., Arunachalam P., Magnus T. $\text{Î}\beta\text{T}$ cells as early sensors of tissue damage and mediators of secondary neurodegeneration // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00368>
20. Debnath M. Adaptive immunity in schizophrenia: Functional implications of T cells in the etiology, course and treatment // *J. of Neuroimmune Pharmacology*. 2015. V. 10. № 4. P. 610–619. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9626-9>
21. Miller B.J., Buckley P., Seabolt W. et al. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects // *Biol. Psychiatry*. 2011.

- V. 70. № 7. P. 663–671.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.04.013>
22. *Potvin S., Stip E., Sepehry A.A. et al.* Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: A systematic quantitative review // *Biol. Psychiatry*. 2008. V. 63. № 8. P. 801–808.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.024>
 23. *Bernstein H.-G., Steiner J., Bogerts B.* Glial cells in schizophrenia: Pathophysiological significance and possible consequences for therapy // *Expert Rev. Neurother*. 2009. V. 9. № 7. P. 1059–1071.
<https://doi.org/10.1586/ern.09.59>
 24. *Van Berckel B.N., Bossong M.G., Boellaard R. et al.* Microglia activation in recent-onset schizophrenia: A quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study // *Biol. Psychiatry*. 2008. V. 64. № 9. P. 820–822.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.04.025>
 25. *Ermakov E.A., Mednova I.A., Boiko A.S. et al.* Chemokine dysregulation and neuroinflammation in schizophrenia: A systematic review // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24. № 3. P. 2215.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032215>
 26. *Murphy C.E., Walker A.K., Weickert C.S.* Neuroinflammation in schizophrenia: The role of nuclear factor kappa B // *Transl. Psychiatry*. 2021. V. 11. № 1. P. 528.
<https://doi.org/10.1038/s41398-021-01607-0>
 27. *Cho M., Lee T.Y., Kwak Y.B. et al.* Adjunctive use of anti-inflammatory drugs for schizophrenia: A meta-analytic investigation of randomized controlled trials // *Australian & New Zeal. J. of Psychiatry*. 2019. V. 53. № 8. P. 742–759.
<https://doi.org/10.1177/0004867419835028>
 28. *Warren R.L., Freeman J.D., Zeng T. et al.* Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes // *Genome Res*. 2011. V. 21. № 5. P. 790–797.
<https://doi.org/10.1101/gr.115428.110>
 29. *Rosati E., Dowds C.M., Liaskou E. et al.* Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis // *BMC Biotechnol*. 2017. V. 17. № 1. P. 61.
<https://doi.org/10.1186/s12896-017-0379-9>
 30. *Aliseychik M., Patrikeev A., Gusev F. et al.* Dissection of the human T-cell receptor γ gene repertoire in the brain and peripheral blood identifies age- and Alzheimer's disease-associated clonotype profiles // *Front. Immunol*. 2020. V. 11.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00012>
 31. *Robinson J., Barker D.J., Georgiou X. et al.* IPD-IMGT/HLA Database // *Nucl. Ac. Res*. 2019.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz950>
 32. *Bagaev D.V., Vroomans R.M.A., Samir J. et al.* VDJdb in 2019: Database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium // *Nucl. Ac. Res*. 2020. V. 48. № D1. P. D1057–D1062.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz874>
 33. *Fan X., Pristach C., Liu E.Y. et al.* Elevated serum levels of C-reactive protein are associated with more severe psychopathology in a subgroup of patients with schizophrenia // *Psychiatry Res*. 2007. V. 149. № 1–3. P. 267–271.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2006.07.011>
 34. *Dickerson F., Stallings C., Origoni A. et al.* C-reactive protein is associated with the severity of cognitive impairment but not of psychiatric symptoms in individuals with schizophrenia // *Schizophr. Res. Elsevier*. 2007. V. 93. № 1–3. P. 261–265.
 35. *Jacomb I., Stanton C., Vasudevan R. et al.* C-reactive protein: Higher during acute psychotic episodes and related to cortical thickness in schizophrenia and healthy controls // *Front. Immunol*. 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02230>
 36. *Fillman S.G., Weickert T.W., Lenroot R.K. et al.* Elevated peripheral cytokines characterize a subgroup of people with schizophrenia displaying poor verbal fluency and reduced Broca's area Vume // *Mol. Psychiatry*. 2016. V. 21. № 8. P. 1090–1098.
<https://doi.org/10.1038/mp.2015.90>
 37. *Debnath M., Berk M., Leboyer M., Tamouza R.* The MHC/HLA gene complex in major psychiatric disorders: Emerging roles and implications // *Curr. Behav. Neurosci. Rep. Springer*. 2018. V. 5. № 2. P. 179–188.
 38. *Eberhard G., Franzén G., Löw B.* Schizophrenia susceptibility and HL-A antigen // *Neuropsychobiology*. 1975. V. 1. № 4. P. 211–217.
<https://doi.org/10.1159/000117496>
 39. *Cazzullo C.L., Smeraldi E.* HLA system, psychiatry and psychopharmacology // *Prog. Neuropsychopharmacol*. 1979. V. 3. № 1–3. P. 137–146.
[https://doi.org/10.1016/0364-7722\(79\)90079-1](https://doi.org/10.1016/0364-7722(79)90079-1)
 40. *Morozova A.Yu., Zubkov E.A., Zorkina Ya.A. et al.* Genetic aspects of schizophrenia // *Zhurnal. Nevrol. Psikiatr. im. S.S. Korsakova*. 2017. V. 117. № 6. P. 126.
<https://doi.org/10.17116/jnevro201711761126-132>
 41. *Druart M., le Magueresse C.* Emerging roles of complement in psychiatric disorders // *Front. Psychiatry*. 2019. V. 10.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00573>
 42. *Trowsdale J., Knight J.C.* Major histocompatibility complex genomics and human disease // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2013. V. 14. № 1. P. 301–323.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153455>
 43. IMGT/HLA Database [Electronic resource]. 2020. URL: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
 44. *Khandaker G.M., Dantzer R., Jones P.B.* Immunopsychiatry: Important facts // *Psychol. Med*. 2017. V. 47. № 13. P. 2229–2237.
<https://doi.org/10.1017/S0033291717000745>
 45. *Tamouza R., Krishnamoorthy R., Leboyer M.* Understanding the genetic contribution of the human leukocyte antigen system to common major psychiatric disorders in a world pandemic context // *Brain Behav. Immun*. 2021. V. 91. P. 731–739.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.09.033>
 46. International Schizophrenia Consortium, *Purcell S.M., Wray N.R., Stone J.L. et al.* Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder // *Nature*. 2009. V. 460. № 7256. P. 748–752.
<https://doi.org/10.1038/nature08185>
 47. *Shi J., Levinson D.F., Duan J. et al.* Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophre-

- nia // *Nature*. 2009. V. 460. № 7256. P. 753–757.
<https://doi.org/10.1038/nature08192>
48. *Stefansson H., Ophoff R.A., Steinberg S. et al.* Common variants conferring risk of schizophrenia // *Nature*. 2009. V. 460. № 7256. P. 744–747.
<https://doi.org/10.1038/nature08186>
 49. Irish Schizophrenia Genomics Consortium and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide association study implicates HLA-C*01:02 as a risk factor at the major histocompatibility complex locus in schizophrenia // *Biol. Psychiatry*. 2012. V. 72. № 8. P. 620–628.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.05.035>
 50. *Tamouza R., Krishnamoorthy R., Giegling I. et al.* The HLA 8.1 ancestral haplotype in schizophrenia: Dual implication in neuro – synaptic pruning and autoimmunity? // *Acta Psychiatr. Scand.* 2020. V. 141. № 2. P. 169–171.
<https://doi.org/10.1111/acps.13125>
 51. *Sekar A., Bialas A.R., de Rivera H. et al.* Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4 // *Nature*. 2016. V. 530. № 7589. P. 177–183.
<https://doi.org/10.1038/nature16549>
 52. *Bian B., Couvy-Duchesne B., Wray N.R., McRae A.F.* The role of critical immune genes in brain disorders: Insights from neuroimaging immunogenetics // *Brain Commun.* 2022. V. 4. № 2.
<https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac078>
 53. *Eaton W.W., Rodriguez K.M., Thomas M.A. et al.* Immunologic profiling in schizophrenia and rheumatoid arthritis // *Psychiatry Res.* 2022. V. 317.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2022.114812>
 54. *Shivakumar V., Debnath M., Venugopal D. et al.* Influence of correlation between HLA-G polymorphism and Interleukin-6 (IL6) gene expression on the risk of schizophrenia // *Cytokine*. 2018. V. 107. P. 59–64.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.016>
 55. *Li J., Yoshikawa A., Alliey-Rodriguez N., Meltzer H.Y.* Schizophrenia risk loci from xMHC region were associated with antipsychotic response in chronic schizophrenic patients with persistent positive symptom // *Transl. Psychiatry*. 2022. V. 12. № 1. P. 92.
<https://doi.org/10.1038/s41398-022-01854-9>
 56. *Tamouza R., Fernell E., Eriksson M.A. et al.* HLA polymorphism in regressive and non-regressive autism: A preliminary study // *Autism Research*. 2020. V. 13. № 2. P. 182–186.
<https://doi.org/10.1002/aur.2217>
 57. *Druart M., Le Magueresse C.* Emerging roles of complement in psychiatric disorders // *Front. Psychiatry*. 2019. V. 10.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00573>
 58. *Wisseemann W.T., Hill-Burns E.M., Zabetian C.P. et al.* Association of Parkinson disease with structural and regulatory variants in the HLA region // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 93. № 5. P. 984–993.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.009>
 59. *Hollenbach J.A., Norman P.J., Creary L.E. et al.* A specific amino acid motif of HLA-DRB1 mediates risk and interacts with smoking history in Parkinson's disease // *PNAS*. 2019. V. 116. № 15. P. 7419–7424.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1821778116>
 60. *Kunkle B.W., Grenier-Boley B., Sims R. et al.* Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates Aβ, tau, immunity and lipid processing // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 3. P. 414–430.
<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>
 61. *Jansen I.E., Savage J.E., Watanabe K. et al.* Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 3. P. 404–413.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>
 62. *Lincoln M.R., Montpetit A., Cader M.Z. et al.* A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. № 10. P. 1108–1112.
<https://doi.org/10.1038/ng1647>
 63. *Patsopoulos N.A., Baranzini S.E., Santaniello A. et al.* Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility // *Science*. 2019. V. 365. № 6460.
<https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
 64. *Kordi-Tamandani D.M., Vaziri S., Dahmardeh N., Torkamanzehi A.* Evaluation of polymorphism, hypermethylation and expression pattern of *CTLA4* gene in a sample of Iranian patients with schizophrenia // *Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 40. № 8. P. 5123–5128.
<https://doi.org/10.1007/s11033-013-2614-3>
 65. *Lu Y., Ruan Y., Hong P. et al.* T cell senescence: A crucial player in autoimmune diseases // *Clin. Immunology*. 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.109202>
 66. *Langerak A.W., Groenen P.J.T.A., Brüggemann M. et al.* EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations // *Leukemia*. 2012. V. 26. № 10. P. 2159–2171.
<https://doi.org/10.1038/leu.2012.246>
 67. *Израильсон М., Касацкая С., Погорельский М. и др.* Анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов // *Иммунология*. ООО Изд. гр. “ГЭОТАР-Медиа”. 2016. V. 37. № 6. P. 347–352.
 68. *Calsolaro V., Edison P.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions // *Alzheimer's & Dementia*. 2016. V. 12. № 6. P. 719–732.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
 69. *De Chirico F., Poeta E., Babini G. et al.* New models of Parkinson's like neuroinflammation in human microglia clone 3: Activation profiles induced by INF-γ plus high glucose and mitochondrial inhibitors // *Front. Cell. Neurosci.* 2022. V. 16.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1038721>
 70. *Pandey J.P., Namboodiri A.M., Elston R.C.* Immunoglobulin G genotypes and the risk of schizophrenia // *Hum. Genet.* 2016. V. 135. № 10. P. 1175–1179.
<https://doi.org/10.1007/s00439-016-1706-2>
 71. *Shirts B., Prasad K., Poguegeile M. et al.* Antibodies to cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus 1 associated with cognitive function in schizophrenia // *Schizophr. Res.* 2008. V. 106. № 2–3. P. 268–274.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2008.07.017>
 72. *Atherton A., Armour K.L., Bell S. et al.* The herpes simplex virus type 1 Fc receptor discriminates between

- IgG1 allotypes // *Eur. J. Immunol.* 2000. V. 30. № 9. P. 2540–2547.
[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200009\)30:9<2540::AID-IMMU2540>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200009)30:9<2540::AID-IMMU2540>3.0.CO;2-S)
73. Pandey J.P., Namboodiri A.M., Radwan F.F., Nietert P.J. The decoy Fcγ receptor encoded by the cytomegalovirus UL119-UL118 gene has differential affinity to IgG proteins expressing different GM allotypes // *Hum. Immunol.* 2015. V. 76. № 8. P. 591–594.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.005>
74. Pandey J.P., Namboodiri A.M., Mohan S. et al. Genetic markers of immunoglobulin G and immunity to cytomegalovirus in patients with breast cancer // *Cell. Immunol.* 2017. V. 312. P. 67–70.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.11.003>
75. Pandey J.P., Namboodiri A.M., Nietert P.J. et al. Immunoglobulin genotypes and cognitive functions in schizophrenia // *Immunogenetics.* 2018. V. 70. № 1. P. 67–72.
<https://doi.org/10.1007/s00251-017-1030-6>
76. Kezai A.M., Lecoer C., Hot D. et al. Association between schizophrenia and *Toxoplasma gondii* infection in Algeria // *Psychiatry Res.* 2020. V. 291.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113293>
77. Wang A.W., Avramopoulos D., Lori A. et al. Genome-wide association study in two populations to determine genetic variants associated with *Toxoplasma gondii* infection and relationship to schizophrenia risk // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2019. V. 92. P. 133–147.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.12.019>
78. Whelan R., St Clair D., Mustard C.J. et al. Study of novel autoantibodies in schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 2018. V. 44. № 6. P. 1341–1349.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbx175>
79. Mehr R. Immune system modeling and analysis // *Front. Immunol.* 2014. V. 5.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00644>
80. Agorastos A., Bozikas V.P. Gut microbiome and adaptive immunity in schizophrenia // *Psychiatriki.* 2019. V. 30. № 3. P. 189–192.
<https://doi.org/10.22365/jpsych.2019.303.189>
81. Li Q., Zhou J., Cao X. et al. Clonal characteristics of T-cell receptor repertoires in violent and non-violent patients with schizophrenia // *Front. Psychiatry.* 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00403>
82. Luo C., Pi X., Hu N. et al. Subtypes of schizophrenia identified by multi-omic measures associated with dysregulated immune function // *Mol. Psychiatry.* 2021. V. 26. № 11. P. 6926–6936.
<https://doi.org/10.1038/s41380-021-01308-6>
83. Gao Y., Fan Y., Yang Z. et al. Systems biological assessment of altered cytokine responses to bacteria and fungi reveals impaired immune functionality in schizophrenia // *Mol. Psychiatry.* 2022. V. 27. № 2. P. 1205–1216.
<https://doi.org/10.1038/s41380-021-01362-0>

Immunogenetic Factors in the Pathogenesis of Schizophrenia

M. Yu. Plotnikova^{a, b, c, *}, S. S. Kunizheva^{a, b, c}, E. V. Rozhdestvenskikh^b, and T. V. Andreeva^{a, b, c}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bCenter for Genetics and Life Sciences, “Sirius” University, Krasnodarskiy krai, nem. Sirius 354340 Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: plotnikova.m.u.1996@gmail.com

Human predisposition to neurological diseases such as schizophrenia, Alzheimer’s, Parkinson’s and other neuropathologies is associated with genetic and environmental factors. One of the promising directions in the area of molecular neurosciences is the study of the role of immunogenetic mechanisms in different types of pathological processes in brain. This review explores the role of complex histocompatibility genes in the pathogenesis of schizophrenia, evaluating changes in the immune repertoire of T- and B-cell receptors in neuroinflammation.

Keywords: immunogenetics, schizophrenia, T-cell receptors, B-cell receptors, genome-wide sequencing, major histocompatibility complex, neuroinflammation, immunoglobulins.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ РЕСУРС ПЫРЕЯ *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey В СЕЛЕКЦИОННОМ УЛУЧШЕНИИ ПШЕНИЦЫ

© 2023 г. Т. В. Коростылева¹, *, А. Н. Шиян¹, Т. И. Одинцова¹

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

*e-mail: tatkor@vigg.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 11.05.2023 г.

Принята к публикации 16.05.2023 г.

Thinopyrum elongatum (Host) D.R. Dewey является ценным генетическим ресурсом, используемым в целях улучшения пшеницы методами геномной инженерии и современными генетическими технологиями, как носитель генома E, базового для рода *Thinopyrum*. Его представители успешно используются в отдаленной гибридизации и создании интрогрессивных линий для переноса генов хозяйственно ценных признаков в новые сорта пшеницы. В настоящем обзоре представлены основные генетически охарактеризованные признаки *Th. elongatum*, перенесенные или желательные для переноса в геном пшеницы: устойчивость к фузариозу, септориозу, к ржавчинным болезням, устойчивость к абиотическим факторам — переувлажнению, засолению почв, к низким температурам, а также гены, влияющие на качество хлебопекарной продукции. Рассмотрены последние результаты в области изучения генома *Th. elongatum* методами геномного и транскриптомного секвенирования.

Ключевые слова: *Thinopyrum elongatum*, устойчивость к фузариозу, устойчивость к ржавчинным болезням, устойчивость к септориозу, интрогрессивные линии, Lg-гены, геном, транскриптом.

DOI: 10.31857/S0016675823100077, **EDN:** UEEZEB

Надвигающееся глобальное потепление грозит сельскохозяйственному производству снижением экологической приспособленности культур, сменной видов и рас привычных патогенов, негативными генетическими процессами [1, 2]. Прогнозируется, что повышение температуры и изменение характера осадков усугубит негативное влияние засухи и может значительно снизить урожайность пшеницы, если не будут созданы сорта, несущие гены устойчивости к этим факторам [3, 4]. В поисках генов устойчивости селекционеры обращаются в первую очередь к сохраненным образцам стародавних сортов пшеницы из разных географических регионов, однако внутри родов *Triticum* и близкородственного *Aegilops* пул таких генов ограничен. Перспективным направлением для улучшения устойчивости пшеницы к различным стрессам является использование в исследовательских и селекционных программах многолетних видов из трибы Triticeae с более отдаленным родством с культурной пшеницей, таких как *Agropyron*, *Elymus*, *Elytrigia*, *Thinopyrum* [5–7].

Дикорастущий вид — пырей удлинённый *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey, является многолетним перекрестноопыляющимся злаком и считается ценным источником генов устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам.

Вид высокоадаптивен к контрастным изменениям экологических условий: засухе, низким температурам, засолению почв и к их заболачиванию, а также устойчив к грибным заболеваниям. В последнее время, благодаря повышенному, по сравнению с пшеницами, содержанию белка в зерновке, он также активно рассматривается как потенциальный донор для улучшения технологических и питательных качеств известных сортов мягкой пшеницы.

ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЫРЕЯ УДЛИНЕННОГО

По современным таксономическим представлениям пырей удлинённый относят к роду *Thinopyrum* A. Löve, который был отделен от более крупного рода пыреи (*Elytrigia*) в 80-х гг. прошлого века вместе с родами *Lophopyrum* и *Trichopyrum* на основе морфологических и цитогенетических данных. Обоснованность такого выделения и принадлежности пырея удлинённого к роду *Thinopyrum* была подтверждена позднее методами молекулярной филогении на основе нуклеотидных последовательностей нетранскрибируемых спейсеров 5S-rРНК [8], а также сравнением транскриптомных и геномных данных по 180 генам у

357 видов Poaceae [9]. Современная классификация дикорастущих полиплоидных видов, родственных пшенице, основана на том, что их хромосомный набор образован разным сочетанием нескольких геномов [10], о происхождении геномов разных видов рода *Thinopyrum* имеются довольно противоречивые сведения. Диплоидные представители *Thinopyrum* несут базовый для этого рода геном E, обозначаемый также E^c, J, J^c [11]. Было показано, что он является наиболее синтетическим геному D из всех известных геномов современных злаков [12–14].

Пырей удлинённый, или *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey, 1984 (syn.: *Lophopyrum elongatum* (Host) Á. Löve, 1980; *Elymus elongatus* (Host) Runemark, 1972; *Elytrigia elongata* (Host) Nevski., 1933; *Agropyron elongatum* (Host) Beauv., 1812) [15] определен как вид с диплоидным набором хромосом ($2n = 2x = 14$, EE), имеющий автополиплоидные тетраплоидные ($2n = 4x = 28$), гексаплоидные ($2n = 6x = 42$) и декаплоидные формы ($2n = 10x = 70$) [16, 17]. При этом в различных литературных источниках существуют противоречия в разграничении декаплоидной формы *Th. elongatum* и другого декаплоидного вида из рода *Thinopyrum* – *Th. ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey (syn. *Elytrigia elongata* auct. nonn.) [15, 18, 19]. Кроме того, ранее эти два вида описывали как один вид под названием *Agropyron elongatum* (Host) Beauv. [20, 21], а также как *Elytrigia elongata* (Host) Nevski [22], что следует учитывать при работе со старыми коллекциями. Нужно отметить, что также существуют сложности в определении видовой принадлежности этих пыреев из-за значительного внутривидового генетического полиморфизма, способности к широкой гибридизации и слабо выраженных морфологических различиях. Определенность вносят исследования их кариотипов с помощью методов геномной гибридизации *in situ* (FISH, GISH), с определением субгеномного состава [23, 24]. Пырей понтийский *Th. ponticum* (Podp.) Barkworth & D.R. Dewey описывается сейчас как декаплоидный вид ($2n = 10x = 70$) с различными геномными составами: автополиплоидным E^b геномом E^bE^bE^bE^bE^b [25] и аллополиплоидными – JJJJ^s [26, 27] и E^cE^bE^xStSt [28], где E^b/E^c/E^x – варианты генома J, происходящие от близкородственных геномов *Th. bessarabicum* (J^b)/*Th. elongatum* (J^c), а геном St (J^s) от близкородственного вида рода *Pseudoroegneria*.

ИСТОРИЯ И ПРАКТИКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *Th. elongatum* В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ

По доступности для использования в скрещивании, селекции и улучшению признаков пшеницы род *Thinopyrum* был в свое время отнесен к третьему генофонду [29]. Основную проблему при

скрещивании пшеницы и диплоидного *Th. elongatum* составляет низкая всхожесть гибридных семян поколения F₁, низкая фертильность гибридов F₁ в отличие от гибридов гексаплоидного пырея промежуточного *Th. intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey. Первое успешное скрещивание пшеницы с пыреями (*Elymus repens* (L.) Gold, syn. *Elytrigia repens* subsp. *repens* (L.) Desv. ex Nevski), а также с видами рода *Thinopyrum* удалось осуществить академику Н.В. Цицину [30]. Его целью было создание зерновой культуры с многолетней вегетацией. Н.В. Цицин в Зональном институте зернового хозяйства Нечерноземной полосы проводил работу по отдаленной гибридизации пшеницы с сизым пыреем (*Agropyron glaucum* (Desf. ex DC.) Roem. & SchulTh., syn. *Th. intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey) для получения сортов озимой мягкой пшеницы [31]. На основе 42-хромосомных форм пшенично-пырейных гибридов (ППГ) 599 и 186 Н.В. Цицин и Г.Д. Лапченко впервые успешно вывели озимые сорта мягкой пшеницы. Растения показывали средний уровень зимостойкости, отдельные селекционные линии содержали в зерне до 19% белка [32]. Для создания улучшенных сортов яровой пшеницы широко использовались линии ППГ 56 и Грекум 114 [33]. С использованием в качестве родителей *Th. elongatum* и *Th. aestivum* cv. China Spring был получен амфиплоид мягкой пшеницы с добавленным геномом E ($2n = 8x = 56$; геном AABBDDDEE) [34], позднее был создан полный набор дисомных аддитивных линий (в которых каждая хромосома *Th. elongatum* была добавлена к геному пшеницы), а также моносомные линии с рядом отдельных хромосом *Thinopyrum* [35–37].

Также академиком Цициным был создан новый синтетический вид злаков – трититригия (\times *Trititrigia cziczinii* Tsvet., syn. *Triticum agropyrotriticum* Cicin, $2n = 56$), геном которой содержит 42 хромосомы мягкой пшеницы и 14 хромосом пырея, в процессе селекции которой были использованы пырей средний (*Elytrigia intermedia* (Host) Nevski) и пырей удлинённый (*E. elongata* (Host) Nevski) [38]. В продолжение работ Н.В. Цицина в Главном ботаническом саду РАН путем скрещивания различных вариантов промежуточных форм ППГ создаются сорта и стабильные по морфологическим и биологическим признакам самоопыляемые линии с различным сочетанием хозяйственно ценных признаков, таких как высокая урожайность, продуктивность колоса, скороспелость, легкий обмолот зерновок, послеуборочное отрастание генеративных побегов, высокие хлебопекарные качества муки [39, 40]. Был зарегистрирован и предлагается к внедрению в сельхозпроизводство перспективный сорт трититригии Памяти Любимовой, сочетающий качества высокоурожайной зерновой и кормовой культуры [41]. Отличительная особенность сорта, привнесенная из генофонда пырея – интенсивное послеуборочное отрастание

новых побегов, позволяющая за вегетационный период снимать до трех укосов зеленой массы.

ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОПАТОГЕНАМ

В российской и мировой практике пырей удлиненный в основном используется в качестве источника генов устойчивости к грибным болезням [33]. Исследования устойчивости *Th. elongatum* к грибным заболеваниям показали, что этот вид несет на длинном плече хромосомы 7 (7EL) участок с локусом высокоэффективной устойчивости к фузариозу колоса (fusarium head blight, FHB) [42, 43], в нем также была локализована устойчивость к листовой (Lr19 и Lr29) и стеблевой (Sr25 и Sr43) ржавчине [44, 45]. Сообщалось также, что устойчивость к FHB может локализоваться и на хромосоме 1E *Th. elongatum*, передавшей этот признак в дисомную аддитивную линию твердой пшеницы DGE-1 [46]. В селекционной работе успешно применяются транслокационные линии, несущие гены устойчивости *Th. elongatum* к бурой и стеблевой ржавчине, оказывающей значительное влияние на урожайность пшеницы — *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr29* [47]. Работы по переносу генов устойчивости к болезням от *A. elongatum* в геном мягкой пшеницы были проведены в США [48, 49] и Китае [50]. В актуальных российских сортах пшеницы преимущественно использованы транслокации с генами *Lr19/Sr25* [51].

В Омском аграрном университете им. П.А. Столыпина с 1990-х гг. велась работа по созданию ППГ на основе *Th. elongatum* (syn. *Agropyron elongatum* (HosTh.) Beauv.), были созданы яровые ППГ разных поколений — 380 образцов, а также 490 интрогрессивных линий на основе этих ППГ [52]. В 2012–2017 гг. на естественном инфекционном фоне при усилении поражения пшеницы грибными болезнями были выделены устойчивые линии ППГ: к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине, к листовой и колосовой форме септориоза, с групповой устойчивостью к ржавчинным болезням. Генетический анализ показал присутствие в интрогрессивных линиях от одного до трех генов устойчивости к бурой ржавчине, отличных от известных *Lr19*, *Lr24*, *Lr29* [53]. В результате был создан набор перспективных линий с генами *Th. elongatum*, сочетающих такие признаки как сокращенный период вегетации, высокая урожайность, устойчивость к комплексу болезней, в том числе и к возбудителям септориоза *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl. и *Septoria tritici* Desm [54].

УСТОЙЧИВОСТИ *Th. elongatum* К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

Генофонд *Th. elongatum*, помимо устойчивости к патогенам, является также источником для повышения устойчивости к абиотическим стрессовым факторам, таким как устойчивость к переувлажнению, засолению почв и низким температурам. Известно, что *Th. elongatum* и *E. repens* обладают лучшей переносимостью избыточного переувлажнения, чем пшеница. В результате экспериментов на пшеничных амфилоидных линиях с чужеродными добавочными хромосомами от *Th. elongatum* было выявлено, что наличие у линии хромосомы 2E связано с положительным влиянием на рост корней в условиях переувлажнения [55]. Причем было доказано, что приобретенный признак не связан эффектом увеличения дозы гомеологичного хроматина, что свидетельствует о локализации комплекса генов, отвечающих за устойчивость к переувлажнению, в длинном плече хромосомы 2E.

Влияние отдельных пар хромосом *Th. elongatum* (syn. *E. elongata*) на солеустойчивость мягкой пшеницы было продемонстрировано в полевых экспериментах на растениях замещенных линий *Th. aestivum* cv. Chinese Spring. Линии с хромосомой 3E при выращивании в условиях среднего и сильного засоления почвы показали более эффективный выброс избыточного Na⁺ и лучшее сохранение уровня внутриклеточного K⁺ во флаговых листьях, а также более высокую сухую массу и урожайность зерна по сравнению с контрольным сортом Chinese Spring [56]. Авторы показали, что повышенная солеустойчивость интрогрессивных линий не сопряжена со снижением продуктивности рецепиентной культуры вне стрессовых условий. Таким образом, интрогрессия локусов хромосомы 3E от *Th. elongatum* очень перспективна для повышения солеустойчивости пшеницы.

В Институте цитологии и генетики СО РАН проводилась работа по интродукции генетического материала пыреев с акцентом на устойчивость к локальным климатическим условиям, холодному стрессу. Исходным материалом для получения морозостойких форм ППГ послужила коллекция семян двух видов, пырея сизого и пырея удлиненного [57], однако более успешным и продуктивным оказался отбор линий с генетическим материалом пырея сизого *Th. intermedium*.

ГЕНЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КАЧЕСТВО ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОДУКЦИИ

Виды *Aegilops* и *Thinopyrum* служат богатым источником генетического разнообразия запасных белков зерна, в первую очередь низкомолекулярных субъединиц глютеина (LMW-GS). Низкомолекулярные глютеины влияют на показатели вязкости и упругости теста, некоторые из аллелей

кодирующих их генов связаны с хорошим качеством выпечки хлеба [58]. В работе японских исследователей было подтверждено, что обогащение твердых сортов пшеницы генами именно LMW-GS значительно повышает качество теста [59], что сделало поиск доноров ценных аллелей весьма актуальным. Разными исследователями были получены гибридные линии пшеницы и *Thinopyrum*, обладающие превосходными показателями качества теста, для некоторых было показано, что улучшение качества не связано с генами высокомолекулярных субъединиц глютенина [60, 61].

Молекулярно-филогенетический анализ восьми клонированных генов LMW-GS из *Th. elongatum* (syn. *A. elongatum*) показал относительно слабую идентичность последовательностей между собой и отличия в структуре генов от их гомеологов из пшеницы и эгилопса [62], что делает их крайне привлекательными для вовлечения в селекцию культурных злаков. В недавней работе китайских исследователей в геноме E *Th. elongatum* было идентифицировано в общей сложности 19 генов α -глиадинов, 9 γ -глиадинов, 19 ω -глиадинов, 2 гена, кодирующих субъединицы высокомолекулярного глютенина (HMW-GS), и 5 генов, кодирующих субъединицы низкомолекулярного глютенина (LMW-GS) [63].

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕНОФОНДА ПЫРЕЯ *Th. elongatum* И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ УСТОЙЧИВОСТИ

Для успешного переноса ценных признаков интрогрессией фрагментов необходимо создание систем картирования и маркирования целевых участков, создания генетических карт видов-доноров. Для генетической характеристики *Th. elongatum*, его гибридов с пшеницей и интрогрессивных линий было разработано и подобрано множество ДНК-маркеров, специфичных для генома J (E): микросателлитных повторов (SSR, simple sequence repeats), экспрессируемых последовательностей (EST, expressed sequence tag), SCAR-маркеров, маркеров консервативных последовательностей (COS, conserved orthologous set) и наборы маркеров однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs, single nucleotide polymorphisms) [14, 32, 64–68]. В 2013 г. китайскими исследователями для получения молекулярных маркеров, высокоспецифичных для хромосомы 7E *Th. elongatum*, была впервые использована технология SLAF-seq (specific length amplified fragment sequencing) [69]. Следует заметить, что отсутствие “эталонного” генома для *Th. elongatum* сильно ограничивало возможности разработки высокоспецифичных маркеров и широкого применения современных методов мар-

кер-ассоциированной селекции (MAC) для переноса материала *Thinopyrum* в пшеницу.

Консенсусная генетическая карта *Th. elongatum* была получена с использованием набора SNP-маркеров (Axiom® Wheat-Relative Genotyping Array) с подтверждением геномной гибридизацией *in situ* (GISH) [15]. Для семи хромосом на карте были локализованы 263 маркера SNP, верифицированных на специфичность к *Th. elongatum*, с плотностью маркеров от 19 до 68 точек на группу сцепления. Плотность была невысока, но исследователям удалось картировать перенесенные от *Th. elongatum* фрагменты в геномах у 134 интрогрессивных линий и их потомков. Конечная цель исследования – с помощью данных маркеров отобрать линии с единичными интрогрессиями, представляющими весь геном E *Th. elongatum* в перекрывающихся сегментах.

Геном пырея удлиненного *Th. elongatum* с диплоидным набором хромосом J^cJ^c , ($2n = 14$) в 2020 г. был просеквенирован и размещен в базе GenBank (номер GCA_011799875.1) в рамках проекта по изучению горизонтального переноса генов грибного патогена в геном злаков на материале биообразца, полученного из Туниса [70]. В результате была получена сборка размером 4.63 Гб с семью группами сцепления и размером контигов N50 – 2.15 Мб. В геноме удалось определить последовательности 44474 генов, кодирующих белки, 41 144 из них были локализованы на семи собранных хромосомах. С помощью полученных геномных данных было выявлено, что локус *Fhb7*, контролирующей устойчивость к фузариозу колоса, кодирует глутатион-S-трансферазу. Фермент инактивирует трихотециновые микотоксины фитопатогена, присоединяя к ним глутатион, что придает растению-хозяину широкую устойчивость к разным видам *Fusarium*. Гомологи нуклеотидной последовательности *Fhb7* не обнаруживались у растений, был сделан вывод, что *Th. elongatum* получил ген *Fhb7* путем горизонтального переноса от эндофитного аскомицета рода *Epichloë* – возбудителя чехловидной болезни злаков. Всего в геноме E было аннотировано 1897 аналогов генов устойчивости. Интрогрессия гена *Fhb7* придает пшенице устойчивость как к фузариозу колоса, так и к корневой гнили в различных фоновых условиях среды без снижения урожайности, что делает его чрезвычайно перспективным для дальнейшего использования в селекции злаковых культур [71].

Применение транскриптомного подхода может расширить возможности выявления из больших семейств генов вариантов, усиливающих экспрессию в ответ на заражение определенным штаммом патогена, то есть идентификацию наиболее функционального локуса из семейства tandemно расположенных гомологов и гомеологов у полиплоидов и у интрогрессивных линий. Так, в

2016 г. было опубликовано исследование, в результате которого были просеквенированы и определены интродуцированные в *Th. aestivum* из *Th. intermedium* гены путем сравнения транскриптомов [72]. Изучение транскриптомов позволило выявить набор генов, различающихся по экспрессии в листьях интрогрессивной линии SN6306 и родительского сорта Yannong 15 при инокуляции их *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, возбудителем мучнистой росы злаков. Важно отметить, что часть из них оказались уникальными, не аннотированными ранее. Следует заметить, однако, что системного изучения транскриптомов у представителей рода *Thinopyrum* до сих пор не проводилось, хотя отдельные работы по функциональной геномике *Th. elongatum* имеются [63]. В базе данных Киотской энциклопедии генов и геномов KEGG (<https://www.kegg.jp>) на настоящий момент отсутствуют данные для этого вида по экспрессии генов различных метаболических путей, но можно прогнозировать их быстрое накопление, в первую очередь данных, которые будут получены при транскриптомном анализе интрогрессивных линий с селекционно ценными признаками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в научно-селекционной практике, в том числе и в России, накоплено значительное количество генетического материала *Th. elongatum* в виде фрагментов генома E различного размера, транслоцированных в интрогрессивные линии мягкой пшеницы. Получены линии, устойчивые к фузариозу колоса корней, листовой и стеблевой ржавчине, септориозу, часть из них охарактеризована как носители генов *Fhb7*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr29*. Получена первичная нуклеотидная последовательность генома E, базового субгенома для видов рода *Thinopyrum*, что значительно расширяет возможности подбора маркерных праймеров и расширения применения методов МАС, точной локализации генов, кодирующих морфологические и селекционно ценные признаки, в том числе и QTL. Обзор исследовательских работ показывает, что общей тенденцией становится перенос генов дикорастущих злаков, охарактеризованных методами геномного и транскриптомного секвенирования. Для отбора интрогрессивных линий это позволит максимально точно определять локализацию функционально значимых для переносимого признака генов и, таким образом, внести желаемый признак без негативных эффектов. Наличие генетически изученных доноров дает возможность пополнить банк генов устойчивости к актуальным расам фитопатогенов и на их основе создать новые неоднородные по генам устойчивости сорта пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-16-00010 (Т.В. Коростылева,

Т.И. Одинцова) и Государственного задания № 0092-2022-0003 (А.Н. Шиян)

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. Fu Y.B., Peterson G.W., Horbach C. et al. Elevated mutation and selection in wild emmer wheat in response to 28 years of global warming // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2019. V. 116(40). P. 20002–20008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909564116>
2. Hoffmann A.A., Sgrò C.M. Climate change and evolutionary adaptation // Nature. 2011. V. 470(7335). P. 479–485. <https://doi.org/10.1038/nature09670>
3. Dempewolf H., Eastwood R.J., Guarino L. et al. Adapting agriculture to climate change: A global initiative to collect, conserve and use crop wild relatives // Agroecol. Sust. Food. 2014. V. 38. P. 369–377. <https://doi.org/10.1080/21683565.2013.870629>
4. Ud Dowla M.A.N., Edwards I., O'Hara G. et al. Developing wheat for improved yield and adaptation under a changing climate: optimization of a few key genes // Engineering. 2018. V. 4. Is. 4. P. 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.06.005>
5. Cui L., Ren Y., Murra T.D. et al. Development of perennial wheat through hybridization between wheat and wheatgrasses: a review // Engineering. 2018. V. 4. Is. 4. P. 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.003>
6. Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы // С.-хоз. биология, 2019. Т. 54. № 3. С. 409–425. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2019.3.409rus>
7. Потоцкая И.В., Шаманин В.П., Айдаров А.Н., Моргунов А.И. Использование пырея среднего (*Thinopyrum intermedium*) в селекции // Вавиловский журн. генет. и селекции. 2022. Т. 26(5) С. 413–421. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-51>
8. Baum B.R., Johnson D.A. *Lophopyrum* Á. Löve (1980), *Thinopyrum* Á. Löve (1980), *Trichopyrum* Á. Löve (1986): One, two or three genera? A study based on the nuclear 5S DNA // Genet. Resources and Crop Evol. 2018. V. 65. P. 161–186. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0519-z>
9. Huang W., Zhang L., Columbus J.T., Hu Y. et al. A well-supported nuclear phylogeny of Poaceae and implications for the evolution of C4 photosynthesis // Mol. Plant. 2022. V. 15. Is. 4. P. 755–777. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.01.015>
10. Wang R.R.-C. Genome relationships in the perennial Triticeae based on diploid hybrids and beyond // Hereditas. 1992. V. 116. P. 133–136. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1992.tb00812.x>

11. Wang R.R., Larson S.R., Jensen K.B. et al. Genome evolution of intermediate wheatgrass as revealed by EST-SSR markers developed from its three progenitor diploid species // *Genome*. 2015. V. 58(2). P. 63–70. <https://doi.org/10.1139/gen-2014-0186>
12. Liu Z., Li D., Zhang X. Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in triticeae revealed by genomic southern and *in situ* hybridization // *J. Integr. Plant Biol.* 2007. V. 4949. P. 1080–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00462.x>
13. Gaál E., Valárik M., Molnár I. et al. Identification of COS markers for *Thinopyrum elongatum* chromosomes preliminary revealed high level of macrosyntenic relationship between the wheat and *Th. elongatum* genomes // *PLoS One*. 2018. V. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208840>
14. Baker L., Grewal S., Yang C.Y. et al. Exploiting the genome of *Thinopyrum elongatum* to expand the gene pool of hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2020. V. 133(7). P. 2213–2226. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03591-3>
15. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:942123-1#synonyms>
16. Guo J., Yu X., Yin H., Liu G. et al. Phylogenetic relationships of *Thinopyrum* and *Triticum* species revealed by SCoT and CDDP markers // *Plant. Syst. Evol.* 2016. V. 302. P. 1301–1309. <https://doi.org/10.1007/s00606-016-1332-4>
17. Mao P., Huang Y., Wang X., Meng L. et al. Cytological evaluation and karyotype analysis in plant germplasms of *Elytrigia* Desv. // *Agr. Sci. China*. 2010. V. 9. P. 553–560. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60251-0](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60251-0)
18. Chen S., Huang Z., Dai Y. et al. The development of 7E chromosome-specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* based on SLAF-seq technology // *PLoS One*. 2013. V. 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065122>
19. <https://www.iucnredlist.org/species/21343347/2141-3455#taxonomy>
20. Shepherd K.W., Islamic A.K.M.R. Fourth compendium of wheat-alien chromosome lines // *Proc. of the 7th Int. Genetic Symp.* Bath: Bath Press, 1988. P. 1373–1398.
21. Li X., Jiang X., Chen X. et al. Molecular cytogenetic identification of a novel wheat-*Agropyron elongatum* chromosomes translocation line with powdery mildew resistance // *PLoS One*. 2017. V. 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184462>
22. http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Elytrigia_elongata/
23. Linc G., Sepsí A., Molnár-Láng M. A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome // *Cytogenet. Genome Res.* 2012. V. 136(2). P. 138–144. <https://doi.org/10.1159/000334835>
24. Kruppa K., Molnár-Láng M. Simultaneous visualization of different genomes (J, JSt and St) in a *Thinopyrum intermedium* × *Thinopyrum ponticum* synthetic hybrid (Poaceae) and in its parental species by multicolour genomic *in situ* hybridization (mcGISH) // *Comp. Cytogenet.* 2016. V. 10. P. 283–293. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v10i2.7305>
25. Arterburn M., Kleinhofs A., Murray T., Jones S. Polymorphic nuclear gene sequences indicate a novel genome donor in the polyploid genus *Thinopyrum* // *Hereditas*. 2011. V. 148. P. 8–27. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2010.02084.x>
26. Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Thomas J.B. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization // *Genome*. 1998. V. 41. P. 580–586.
27. Brasileiro-Vidal A.C., Cuadrado A., Brammer S.P. et al. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poacea) using *in situ* hybridization with different DNA sequences // *Genet. Mol. Biol.* 2003. V. 26. P. 505–510. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572003000400014>
28. Zhang X., Dong Y., Wang R.R.C. Characterisation of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* by *in situ* hybridization, isozyme analysis, and RAPD // *Genome*. 1996. V. 39. P. 1062–1071. <https://doi.org/10.1139/g96-133>
29. Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. et al. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // *Euphytica*. 1996. V. 91. P. 59–87. <https://doi.org/10.1007/BF00035277>
30. Tsitsin N.V. Remote hybridization as a method of creating new species and varieties of plants // *Euphytica*. 1965. V. 14 (3). P. 326–330.
31. Ланченко Г.Д. Применение метода отдаленной гибридизации в селекции озимой пшеницы // *Селекция и семеноводство*. 1967. Т. 2. С. 33–38.
32. Sandukhadze B.I., Mamedov R.Z., Krakhmalyova M.S., Bugrova V.V. Scientific breeding of winter bread wheat in the Non-Chernozem zone of Russia: The history, methods and result // *Vavilov. Zh. Genet. Selektcii*. 2021. V. 25(4). P. 367–373. <https://doi.org/10.18699/VJ21.53-o>
33. Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Крупнов В.А. Генеалогический анализ использования двух видов пырея (*Agropyron*) в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на устойчивость к болезням // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 2. С. 179–188.
34. Sharma H.C., Gill B.S. New hybrids between *Agropyron* and wheat. Production, morphology and cytogenetic analysis of F1 hybrids and backcross derivatives // *Theor. Appl. Genet.* 1983. V. 66. № 2. P. 111–121.
35. Rommel R., Jenkins B.C. Amphiploids in Triticinae produced at the University of Manitoba from March 1958 to December 1959 // *Wheat Inf. Service*. 1959. V. 9/10. P. 23.
36. Dvorak J., Knott D.R. Disomic and ditelosomic additions of diploid *Agropyron elongatum* chromosome to *Triticum aestivum* // *Canad. J. Genet. and Cytol.* 1974. V. 16(2). P. 399–417. <https://doi.org/10.1139/g74-043>
37. Lammer D., Cai X., Arterburn M. et al. A single chromosome addition from *Thinopyrum elongatum* confers a polycarpic, perennial habit to annual wheat // *J. Exp.*

- Bot. 2004. V. 55(403). P. 1715–1720.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh209>
38. Уелниек В.П., Белов В.И., Иванова Л.П. и др. Наследие академика Н.В. Цицина – современное состояние и перспективы использования коллекции промежуточных пшенично-пырейных гибридов // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 3. С. 667–674.
 39. Шуклина О.А., Завгородний С.В., Аленичева А.Д. и др. Связь элементов структуры колоса с продуктивностью растений образцов × *Triticum aestivum* L. // Изв. Тимирязевской с.-хоз. академии. 2022. № 5. С. 57–69.
<https://doi.org/10.26897/0021-342X-2022-5-57-69>
 40. Погост А.А., Лошакова П.О., Клименков Ф.И. и др. Новые яровые пшенично-пырейные гибриды, созданные в отделе отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН // Междунар. научно-исследов. журн. 2021. № 12. С. 114.
<https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.114.12.024>
 41. Белов В.И., Завгородний С.В. Селекционное достижение: Трититригия Памяти Любимовой // Пат. № 11203. Российская Федерация: 22.07.2020. Заявитель и патентообладатель – Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН. Заявл. 14.01.2019. Опубл. 22.07.2020.
 42. Han F.P., Fedak G. Molecular characterization of partial amphiploids from *Triticum durum* × tetraploid *Thinopyrum elongatum* as novel source of resistance to wheat Fusarium head blight // Proc. 10th Int. Wheat Genet. Symp. Paestum. 2003. P. 1148–1150.
 43. Miller S.S., Watson E.M., Lazebnik J. et al. Characterization of an alien source of resistance to Fusarium head blight transferred to Chinese spring wheat // Botany. 2011. V. 89. P. 301–311.
<https://doi.org/10.1139/b11-017>
 44. Ceoloni C., Forte P., Kuzmanović L. et al. Cytogenetic mapping of a major locus for resistance to Fusarium headblight and crown rot of wheat on *Thinopyrum elongatum* 7EL and its pyramiding with valuable genes from a *Th. ponticum* homoeologous arm onto bread wheat 7DL // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 2005–2024.
<https://doi.org/10.1007/s00122-017-2939-8>
 45. Konkin D., Hsueh Y.C., Kirzinger M. et al. Genomic sequencing of *Thinopyrum elongatum* chromosome arm 7EL, carrying fusarium head blight resistance, and characterization of its impact on the transcriptome of the introgressed line CS-7EL // BMC Genomics. 2022. V. 23(1). P. 228.
<https://doi.org/10.1186/s12864-022-08433-8>
 46. Jauhar P.P., Peterson T.H.S., Xu S. Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to Fusarium head blight // Genome. 2009. V. 52. P. 467–483.
<https://doi.org/10.1139/G09-014>
 47. Ковальшина А.Н., Дмитренко Ю.М. Источники устойчивости к возбудителю бурой ржавчины и их использование в создании сортов пшеницы мягкой // Plant Varieties Studying and Protection. 2017. Т. 13. № 4. С. 369–386.
<https://doi.org/10.21498/2518-1017.13.4.2017.117742>
 48. Knott D.R. The inheritance of rust resistance. VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat // Can. J. Plant Sci. 1961. V. 41. P. 109–123.
 49. Gough F.J., Merkle O.G. Inheritance of stem and leaf rust resistance in Agent and Agrus cultivars of *Triticum aestivum* // Phytopathology. 1971. V. 61. P. 1501–1505.
 50. Li Z., Li B., Tong Y. The contribution of distant hybridization with decaploid *Agropyron elongatum* to wheat improvement in China // J. Genet. Genomics. 2008. V. 35. P. 451–456.
[https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60062-4](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60062-4)
 51. Гультяева Е.И. Устойчивость российских сортов мягкой пшеницы к бурой ржавчине // 125 лет прикладной ботаники в России. Сб. тезисов. СПб: ФИЦ ВИР им. Н.И. Вавилова, 2019. С. 217–218.
 52. Плотникова Л.Я., Айдосова А.Т., Рысбекова А.Н., Мясников А.Ю. Интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генами пырея удлиненного *Agropyron elongatum* устойчивые к листовым болезням на юге Западной Сибири // Вестник Омского ГАУ. 2014. № 4(16). С. 3–7.
 53. Сагендыкова А.Т. Создание селекционного материала яровой мягкой пшеницы устойчивого к болезням и абиотическим факторам среды на основе *Agropyron elongatum*: Автореф. дисс. ... канд. с.-хоз. наук. Тюмень: Гос. аграр. ун-т Сев. Зауралья, 2021. 18 с.
 54. Плотникова Л.Я., Сагендыкова А.Т., Бережкова Г.А. Перспективные интрогрессивные линии яровой пшеницы с генами *Agropyron elongatum* устойчивые к септориозу в Западной Сибири // Вестник Казанского ГАУ. 2017. № 3(45). С. 39–45.
 55. Taeb M., Koebner R.M., Forster B.P. Genetic variation for waterlogging tolerance in the Triticeae and the chromosomal location of genes conferring waterlogging tolerance in *Thinopyrum elongatum* // Genome. 1993. V. 36(5). P. 825–30.
<https://doi.org/10.1139/g93-110>
 56. Omielan J.A., Epstein E., Dvořák J. Salt tolerance and ionic relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt-tolerant *Lophopyrum elongatum* // Genome. 1991. V. 34. P. 961–974.
 57. Размахнин Е.П., Размахнина Т.М., Козлов В.Е. и др. Получение высокоморозостойких форм пшенично-пырейных гибридов // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 240–249.
 58. Subedi M., Ghimire B., Bagwell J.W. et al. Wheat end-use quality: State of art, genetics, genomics-assisted improvement, future challenges, and opportunities // Front. Genet. 2023. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1032601>
 59. Maruyama-Funatsuki W., Takata K., Funatsuki H. et al. Identification and characterization of a novel LMW-s glutenin gene of a Canadian Western Extra-Strong wheat // J. of Cereal Sci. 2005. V. 41. Is. 1. P. 47–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.07.003>
 60. Fan S.H., Guo A.G. A study on the origin of HMW glutenin subunit 14 and 15 in Xiao Yan 6 // Acta Univ. Agric. Boreali-Occidentalia. 2000. V. 28(6). P. 1–5.
 61. Feng D.S., Xia G.M., Zhao S.Y., Chen F.G. Two quality-associated HMW glutenin subunits in a somatic hybrid

- line between *Triticum aestivum* and *Agropyron elongatum* // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 110. P. 136–144. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1810-x>
62. Luo Z., Chen F., Feng D., Xia G. LMW-GS genes in *Agropyron elongatum* and their potential value in wheat breeding // Theor. and Applied Genet. 2005. V. 111(2). P. 272–280. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2021-9>
63. Ge W., Gao Y., Xu S. et al. Genome-wide identification, characteristics and expression of the prolamin genes in *Thinopyrum elongatum* // BMC Genomics. 2021. V. 22(1). P. 864. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08088-x>
64. Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Адаптация микросателлитных SSR-маркеров пшеницы для анализа геномов пырея среднего, пырея удлинённого и пшенично-пырейных гибридов // Изв. Тимирязев. с.-хоз. академии. 2011. Т. 3. С. 49–57.
65. Hu L.-J., Liu C., Zeng Z.-X. et al. Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrum elongatum* revealed by mapped functional markers // Genes Genom. 2012. V. 34. P. 67–75. <https://doi.org/10.1007/s13258-011-0153-7>
66. Chen S., Gao Y., Zhu X. et al. Development of E-chromosome specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* in a wheat background // Crop Sci. 2015. V. 55. P. 2777–2785. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.08.0539>
67. Dong L., Zhang K., Wang D. et al. High-throughput mining of E-genome-specific SNPs for characterizing *Thinopyrum elongatum* introgressions in common wheat // Mol. Ecol. Res. 2017. V. 17. P. 1318–1329. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12659>
68. Lou H., Dong L., Zhang K. et al. High-throughput mining of E-genome-specific SNPs for characterizing *Thinopyrum elongatum* introgressions in common wheat // Mol. Ecol. Res. 2017. V. 17(6). P. 1318–1329. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12659>
69. Chen S., Huang Z., Dai Y. et al. The development of 7E chromosome-specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* based on SLAF-seq technology // PLoS One. 2013. V. 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065122>
70. Wang H., Sun S., Ge W. et al. Horizontal gene transfer of Fhb7 from fungus underlies fusarium head blight resistance in wheat // Science. 2020. V. 368(6493). <https://doi.org/10.1126/science.aba5435>
71. Haldar A., Tekieh F., Balcerzak M. et al. Introgression of *Thinopyrum elongatum* DNA fragments carrying resistance to fusarium head blight into *Triticum aestivum* cultivar Chinese Spring is associated with alteration of gene expression // Genome. 2021. V. 64(11). P. 1009–1020. <https://doi.org/10.1139/gen-2020-0152>
72. Li Q., Niu Z., Bao Y. et al. Transcriptome analysis of genes related to resistance against powdery mildew in wheat – *Thinopyrum* alien addition disomic line germplasm SN6306 // Gene. 2016. V. 590(1). P. 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.005>

The Genetic Resource of *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey in Breeding Improvement of Wheat

T. V. Korostyleva^a, *, A. N. Shiyan^a, and T. I. Odintsova^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tatkor@vigg.ru

Thinopyrum elongatum (Host) D.R. Dewey is a valuable resource for the application of genomic engineering and modern genetic technologies aimed at wheat improvement because it carries genome E, the parent genome of the *Thinopyrum* genus. Its representatives are successfully used in distant hybridization and production of introgressive lines for transferring genes of economically valuable traits into new wheat varieties. This review presents the available data on the main genetically characterized traits of *Th. elongatum* that have been or can be used for transfer into the wheat genome. These traits include resistance to fusariosis, septoriosis, rust diseases, and abiotic environmental factors – overwatering, soil salinity and low temperatures, as well as the traits that determine the quality of bakery products. The latest studies of *Th. elongatum* genome by genome and transcriptome sequencing are also considered.

Keywords: *Thinopyrum elongatum*, resistance to fusariosis, resistance to rusts, resistance to septoriosis, introgressive lines, Lr genes, genome, transcriptome.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РЕФЛЕКТОРНЫХ ЭПИЛЕПСИЙ

© 2023 г. Н. А. Дудко^{1, 2, *}, С. С. Кунижева^{1, 2, 3}, Т. В. Андреева^{1, 2, 3},
И. Ю. Адрианова², Е. И. Рогаев^{1, 3, 4}

¹Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет “Сириус”,
Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Центр генетики и генетических технологий, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

⁴Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, МА, 01545 США
*e-mail: dudko@rogaevlab.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Рефлекторные эпилепсии относятся к сравнительно редким формам эпилепсий. Обычно рефлекторные эпилептические приступы являются частью комплексного фенотипа, что усложняет возможность выявления генетических факторов, лежащих в их основе. Многочисленные генетические исследования рефлекторных эпилепсий как на животных моделях, так и у человека позволяют предположить сложную гетерогенную природу этих неврологических расстройств. В данном обзоре рассматриваются основные результаты, полученные в последние годы при исследовании молекулярно-генетических факторов рефлекторной эпилепсии, в том числе освещаются новые данные о механизмах генетической регуляции при рефлекторных эпилепсиях, вызываемых такими триггерами как аудио- и видео-стимуляция, потребление пищи, чтение, контакт с водой и гипоксия. Представлены результаты, полученные в исследованиях на животных моделях и пациентах с использованием технологии секвенирования следующего поколения.

Ключевые слова: рефлекторная эпилепсия, генетические факторы, аудиогенные приступы, фоточувствительность, эпилепсия горячей воды.

DOI: 10.31857/S0016675823100041, EDN: UDZYMW

Эпилепсия классифицируется как расстройство головного мозга, характеризующееся стойкой предрасположенностью к возникновению повторяющихся эпилептических приступов [1]. К эпилептическим приступам относят преходящее появление признаков и/или симптомов, связанных с аномально синхронизированной и интенсивной активностью нейронов в разных отделах головного мозга. Одной из редких форм эпилепсии является рефлекторная (РЭ), составляющая около 4–7% от всех форм и встречающаяся у пациентов всех возрастных групп. Отличительной особенностью РЭ является индуцированность рефлекторных эпилептических приступов специфическими стимулами или триггерами. При этом такие провоцирующие факторы как стресс, усталость, алкоголь могут снижать эпилептогенный порог для специфических стимулов [2]. Триггеры могут быть внешними (визуальные, слуховые, осязательные, погружение в воду, вестибулярные и др.), внутренними (сигналы от рецепторов внутренних органов, конечностей) или сочетанием внешних и

внутренних факторов [3]. Внешние стимулы могут быть простыми (вспышки света, отсутствие фиксации, горячая вода) или сложными (чтение, прослушивание музыки), элементарными (движение) или связанными с высшими мозговыми функциями, такими как эмоции, мышление, вычисление [4]. В зависимости от стимула выделяют разные подтипы РЭ, которые называют в соответствии с триггером, например, эпилепсия чистки зубов [5], эпилепсия чтения [6], эпилепсия погружения в горячую воду [7] и т.д. Разные подтипы РЭ отличаются по клиническим и электрофизиологическим проявлениям. Рефлекторные эпилепсии могут сопровождаться фокальными или генерализованными приступами, в зависимости от степени вовлечения структур головного мозга. В случае фокальных, или очаговых приступов, судороги генерируются в ограниченной, четко локализованной зоне, тогда как в случае генерализованной РЭ возбуждение охватывает многие области обоих полушарий. При этом ряд эпилептических синдромов (ювенильная миоклоническая эпилепсия,

синдром Драве, прогрессивная миоклоническая эпилепсия) обнаруживают коморбидность с РЭ [8].

В основе РЭ часто лежат нарушенные взаимодействия нескольких или даже многих генов, а также влияние факторов окружающей среды [9–12]. Реже встречаются эпилепсии с рефлекторными приступами, когда заболевание обусловлено изменениями в определенном гене. Но даже в этом случае пенетрантность мутации не всегда полная, и тяжесть, и характер эпилептических приступов во многом зависят от сопутствующего генетического окружения. Мутации могут наследоваться от родителей, обуславливая семейные случаи, возникать *de novo* у ребенка или быть результатом соматического химеризма в процессе индивидуального развития. В целом считается, что только 20–30% случаев всех эпилепсий являются следствием внешних факторов, тогда как 70–80% случаев обусловлены генетическими нарушениями [13].

Прогресс в геномных технологиях, таких как секвенирование следующего поколения (NGS), секвенирование полного экзона (WES), секвенирование полного транскриптома (RNA-seq), позволил идентифицировать на сегодняшний день около 1000 генетических вариаций, так или иначе потенциально ассоциированных с эпилепсией, в том числе с РЭ [10]. Полученные биологические и генетические данные аккумулируются на международных ресурсах, например таких как база данных EpilepsyGene (wzgenomics.cn), или фонд эпилепсий KCNT1 Epilepsy Foundation (<https://kent1epilepsy.org/>), объединяющих исследователей, клиницистов и пациентов. Кроме того, для изучения генетики всех типов эпилепсий создано несколько международных консорциумов, таких как ILAE, Epi4K, EPIGEN, EuroEPINOMIC00, EpiCURE и другие, целью которых было объединенными усилиями разных исследовательских команд накапливать и обрабатывать многочисленные генетические данные для открытия новых биологических маркеров всех типов эпилепсий [13]. Это способствует дальнейшему прогрессу в понимании механизмов эпилептогенеза и подборе таргетной терапии. Особенно это актуально для РЭ, которую, согласно современной классификации ILAE, не выделяют в самостоятельное заболевание [14]. Тем не менее, идентификация триггеров, изучение механизмов возникновения и развития приступов, а также выявление генетических факторов, лежащих в основе РЭ, необходимы для профилактики рефлекторных приступов, поскольку они часто с трудом купируются противосудорожными препаратами, либо резистентны к ним, что сильно ухудшает качество жизни людей [15].

В настоящем обзоре рассматриваются актуальные результаты в области поиска генов, ассоциированных с РЭ, полученных как в экспери-

ментах на модельных животных линиях, так и в ходе ретроспективных исследований на пациентах.

АУДИОГЕННАЯ ЭПИЛЕПСИЯ

Аудиогенная эпилепсия является частной формой РЭ, характеризующейся аудиогенными эпилептическими судорогами (АЭС), запускаемыми звуковой стимуляцией. Аудиогенные триггеры считаются одними из самых распространенных среди стимулов РЭ, и могут быть простыми (вздрагивание) или сложными (музыкагенные судороги, приступы, провоцируемые голосом). Повышенный интерес к исследованию генетических механизмов АЭС обусловлен тем, что аудиогенные приступы сопровождают многие заболевания/синдромы, однако значительная доля случаев этих эпилепсий по-прежнему не поддается медикаментозному лечению, и в настоящее время идет активный поиск фармакологических мишеней для создания таргетных противосудорожных препаратов.

Музыкагенная эпилепсия, триггером для которой является прослушивание музыки, относится к редким формам аудиогенной эпилепсии, встречающейся с частотой 1 : 10000000 в популяции [16]. Впервые термин “музыкагенная эпилепсия” был предложен в 1937 г. при описании эпилептических приступов у пациентки при прослушивании музыки [17]. Музыка относится к сложным триггерам, так как музыка может провоцировать эмоциональное состояние, которое само по себе является причиной приступов [16]. Это затрудняет поиск механизмов и генетических факторов, ответственных за это редкое нарушение. К настоящему времени известен пока только один кандидатный ген (*SCN1A*), в котором была обнаружена ранее не описанная мутация – делеция с.4021delC, приводящая к формированию стоп-кодона (Leu1341fsX1348). Данная мутация была выявлена у пациента с музыкагенными судорогами, страдающего синдромом Драве (разновидность эпилептической энцефалопатии) [18]. Мутации в гене *SCN1A*, кодирующем субъединицу натриевого канала, давно известны для данного синдрома [19], который чаще сопровождается фебрильными судорогами. В данном исследовании впервые для этого синдрома были зафиксированы музыкагенные рефлекторные судороги. Авторы предположили, что патогенез данного типа эпилепсии может быть обусловлен дисфункцией тормозной ГАМКергической системы в головном мозге вследствие нарушения функционирования гена *SCN1A* [18].

К редким формам аудиогенных РЭ можно отнести телефон-индуцированную идиопатическую рефлекторную эпилепсию [20]. У пациента с данным заболеванием была выявлена *de novo* гетерозиготная мутация в экзоне 4 гена *LGII/Epi-tempin* (с.406С-Т), приводящая к замене аминокислоты

кислоты аргинина на триптофан (Arg136Trp) [21]. Гетерозиготная мутация в данном гене была также идентифицирована и в случае с судорогами, которые провоцировались звуком или речью [22], а также в ряде случаев аутомно-доминантной парциальной эпилепсии со слуховыми симптомами (ADPEAF) [23]. В экспериментах на мышах с направленным нарушением гена *LGII* было показано, что фенотипические последствия зависят от дозы гена, и мыши с нокаутом этого гена преждевременно погибали, и только при генотипе *LGII* (+/–) у животных после слуховой стимуляции появлялись аудиогенные судороги [24]. Было высказано предположение, что гаплонедостаточность гена *LGII* может оказывать влияние на возбудимость мозга путем регуляции синаптической передачи в процессе развития нейронов.

В настоящее время генетические исследования аудиогенных РЭ выполняются преимущественно на модельных животных, прежде всего, благодаря существованию аудиогенно-чувствительных линий грызунов, первая из которых, названная “линия Крушинского–Молодкиной” (КМ), была получена еще в конце 40-х гг. на базе МГУ им. М.В. Ломоносова [25]. К другим модельным объектам можно отнести линии крыс GEPR [26] и WAR [27], линии мышей Swiss-Webster [28] и хомяков GASH/Sal [29] и другие. Особенностью этих линий является полигенная природа их аудиогенных приступов, сопоставимых с судорожными состояниями, которые наблюдаются у людей при АЭС.

Для изучения аудиогенных эпилепсий чаще всего применяют WES- или RNA-seq-анализ областей мозга, ответственных за возникновение и распространение аудиогенных судорог в животных линиях, либо таргетно исследуется экспрессия генов, ответственных за развитие и функционирование ЦНС. Например в исследованиях на разных линиях модельных животных был идентифицирован ген *EGR3*, кодирующий регулятор транскрипции, принадлежащий к семейству EGR белков цинковых пальцев. В частности, при анализе транскриптомов в нижнем двухолмии после стимуляции звуком была выявлена сверхэкспрессия данного гена в линиях крыс WAR и хомяков GASH/Sal [30], а также в мутантной линии мышей Swiss-Webster [28].

В другом исследовании на линии хомяков GASH/Sal на основе WES-анализа был идентифицирован более высокий уровень экспрессии генов *ASB14*, *MSH3* и *ARHGFB38* по сравнению с контрольными хомяками [31]. Также в данном исследовании были выявлены мутации генов *SACNA1A*, *ZEB2* или *GRIK1*, ранее ассоциированные с различными типами эпилепсии. Известно, что все эти гены вовлечены в сигнальные пути, непосредственно связанные с возбудимостью нейронов, включая глутаматергические синапсы.

В исследовании на крысах линии КМ была выявлена активация экспрессии гена *ERK1/2*, приводящая к усилению глутаматергической синаптической передачи за счет увеличения экскреции глутамата и последующей стимуляции и увеличения числа рецепторов NMDA, что указывает на возможное участие данного гена в механизмах индукции аудиогенных судорог [32]. Эти результаты согласуются с данными, полученными на этой же линии КМ, где на основе анализа транскриптома идентифицирована повышенная экспрессия ряда генов, участвующих в позитивной регуляции сигнального каскада MAPK [33], а также с результатами исследования мышей с нокаутом гена *GRIN2a*, кодирующего субъединицу глутамат-зависимого ионного канала (NMDA), у которых аудиогенные приступы возникали из-за гипервозбудимых цепей среднего мозга [33].

Для изучения влияния отдельных генов, предположительно ответственных за АЭС, используются экспериментально полученные линии мышей, у которых целенаправленный нокаут этих генов упрощает выявление причинно-следственных связей между известной мутацией и развитием эпилептических приступов. Одной из таких линий являются мыши Fmg1 [35], у которых блокирование гена *FMRI*, участвующего в развитии нейронов и регуляции их синаптической пластичности, приводил к формированию фенотипа с АЭС. Авторы предположили, что дисфункция гена *FMRI* приводит к дисбалансу возбуждающей (глутаматные рецепторы группы I) и тормозящей (ионотропные ГАМК рецепторы) нейромедиаторных систем в головном мозге, что, вероятно, и способствует возникновению аудиогенных приступов.

Еще одним кандидатным геном, нарушения в котором могут влиять на индукцию АЭС, является ген *MASSI*, спонтанные мутации в котором были обнаружены у мышей Frings при секвенировании этой области генома, и были ассоциированы у животных с аудиогенными судорогами [36]. Исследования, проведенные на модельной линии мышей Black Swiss (BLSW) и на пациентах с аутомно-рецессивной нейросенсорной тугоухостью (DFNB95) на основе анализа экзомов, выявили миссенс-мутации в гене *GIPC3*, приводящие у мышей к аудиогенным приступам и прогрессирующей нейросенсорной тугоухости [37]. Мутации в данном гене были найдены и у других пациентов с данным синдромом [38].

Помимо вышеописанных молекулярных механизмов определенный вклад в формирование предрасположенности к АЭС может вносить нейровоспаление, сопровождающее многие неврологические нарушения, в том числе и эпилепсию. В исследовании на мышах линии Tremor был проведен анализ уровня экспрессии мРНК в гиппокампе генов *IL-1 β* , *IL-6*, *CCL3*, *CCL4*, *TNF- α* , *EGR3*,

GABRA1 и *GABRA4* [39]. Было обнаружено снижение экспрессии генов *CCL3* и *IL-1 β* и повышение экспрессии гена *IL6* после стимуляции судорог по сравнению с наивными животными. Авторы предположили участие противовоспалительных цитокинов, в частности *IL-1 β* , в механизме запуска аудиогенных приступов у мышей.

ФОТОСЕНСИТИВНАЯ ЭПИЛЕПСИЯ

Другой разновидностью рефлекторных эпилепсий является фотосенситивная эпилепсия (ФСЭ), впервые описанная в литературе в 1885 г., триггером которой выступает чаще всего прерывистая световая стимуляция [40]. Частота ФСЭ составляет около 2–5% всех пациентов с эпилептическими приступами, и встречается она в два раза чаще у детей, чем у взрослых [40, 41]. Фотосенситивность чаще встречается при идиопатической генерализованной эпилепсии, а в некоторых случаях, имеет место коморбидность состояний, когда судорожные приступы могут запускаться одновременно фото- и аудио-триггерами [42, 43]. Исследования семейных и близнецовых случаев свидетельствуют, что большая часть ФСЭ является генетически детерминированной [41].

Ранее молекулярно-генетические исследования фотосенситивной эпилепсии выявили кандидатные локусы на хромосомах 6 (6p21.2), 7 (7q32), 13 (13q31.3) и 16 (16p13) [41, 44]. Было отмечено, что выявленные геномные области содержат гены, которые участвуют в нейромодуляции коры головного мозга, например, гены, кодирующие метаболитные рецепторы глутамата (*GRM8* и *GRM4*), ГАМК-В-рецептор (*GABBR1*) и ацетилхолиновый мускариновый рецептор (*CHRM2*), а также гены калиевых каналов (*KCNK16* и *KCNK17*) и *ALDH5A1*, кодирующий фермент семейства альдегиддегидрогеназ. Ген *ALDH5A1*, по мнению исследователей, является перспективным геном-кандидатом, поскольку его дефицит нарушает деградацию ГАМК, и приводит к эпилепсии из-за накопления чрезмерных уровней ГАМК [45]. Более того, в литературе приведены данные о выявлении при анализе экзона гетерозиготной мутации в гене *ALDH5A1* у пациентки с фотосенситивной эпилепсией, переданной ей от родителей и приводящей к альтернативному сплайсингу мРНК, лишённой экзона 9 и, как следствие, к дефициту по гену *ALDH5A1* [46]. Нокаут по гену *GABRG2*, кодирующему ГАМК-А-рецептор в искусственно выведенной линии Данио Рерио (R23X), также демонстрирует фенотип, схожий с фоточувствительными приступами, подтверждая, что опосредованное ГАМК-ингибирование нейротрансмиссии обуславливает широкий спектр эпилепсий [47]. А нокаут по гену *KCNJ16*, кодирующему субъединицу калиевого канала, в линии крыс, приводил к формированию комплексного фенотипа, сопро-

вождающегося свето- и аудиогенной чувствительностью, а также чувствительностью к соли [43]. Вероятно мутации в генах, кодирующих каналы, изменяют возбудимость нейронов таким образом, что рефлекторные приступы могут запускаться в ответ на фото- и аудио-стимулы.

В индийском исследовании, проведенном на детях с лекарственно-устойчивой эпилепсией, сопровождающейся светочувствительностью, на основе таргетного экзомного секвенирования с использованием клинической панели генов эпилепсии, были обнаружены патогенные варианты генов *SCN1A*, *CHD2* и *CACNA1H* [48]. Примечательно, что мутации в гене *SCN1A* и в генах, кодирующих субъединицы потенциал-зависимых кальциевых каналов (*CACNA1H* и *CACNA1A*), были выявлены и у пациентов с аудиогенной РЭ [18, 35].

В результате WES-анализа у пациентов с чувствительностью к свету выявились 11 уникальных вариантов данного гена, большинство из которых было отнесено к патогенным или потенциально патогенным [48]. Ген *CHD2* был также идентифицирован в качестве кандидата для ФСЭ еще в нескольких исследованиях, поскольку был единственным общим геном в перекрывающихся вариантах в области хромосомы 15q26.1. Также в этом исследовании на модельном объекте рыбок Данио Рерио авторы показали, что частичная потеря функции данного гена, участвующего в регуляции транскрипции, вызывала у рыб повышенную фоточувствительность. Поскольку ген *CHD2* не кодирует белки ионных каналов, возможно существует другой механизм возникновения повышенной возбудимости коры головного мозга [48, 49].

Еще один кандидатный ген был обнаружен в исследовании семейного случая ФСЭ, где у всех членов семьи была выявлена общая гетерозиготная мутация *R129C* в гене *SCNM1*, регулирующем сплайсинг потенциалзависимых натриевых каналов [50].

В другом исследовании у трех родственных пациентов с симптомами ювенильной миоклонической и затылочной фоточувствительной эпилепсий, а также мигрени были выявлены крупная несбалансированная транслокация (t(4;8) (p15.2; p23.2)) и делеция (5q12.3) [51]. В результате данной транслокации у пациентов функционировал только один аллель гена *CSMD1*, и была повышена экспрессия гена *STIM2*, в 3'UTR-область которого попал транслоцируемый регион. Кроме того, делеция в локусе 5q12.3 частично затрагивала ген *RGS7BP*, являющийся регуляторным белком, но в литературе не ассоциированный с эпилепсиями. Ген *CSMD1* является гомологом гена *CSMD3*, мутации в котором уже были ассоциированы с эпилепсией [52]. В другом исследовании на пациентах с коморбидной эпилепсией с фоточувствительными приступами из четырех семей, методом NGS и

сравнительной геномной гибридизации были выявлены три миссенс-варианта и одна делеция в гене *RORB* [53]. Анализ *in silico* предсказал патогенность всех миссенс-вариантов, делеция же, затрагивающая весь экзон, вероятнее всего может приводить к сдвигу рамки и укорачиванию белка. *RORB* экспрессируется в сетчатке, а также в нейронах таламо-кортикальной сети, лежащей в основе формирования приступов, и сочетание аномалии нейрональной и зрительной сетей может потенциально играть роль в усилении фоточувствительности [54]. При изучении пациентов из европейских референс-центров по эпилепсии с энцефалопатиями и с редким фоточувствительным триггером в виде закрытия глаз были выявлены 15 патогенных вариантов в гене *SYNGAP1*, 14 из которых были *de novo* [55]. На фоточувствительной эпилептической линии кур Фері была выявлена аутосомно-рецессивная мутация во втором интроне гена *SV2A*, продукт которого необходим для нормальной нейротрансмиссии [56]. Более того, у людей с труднокупируемыми случаями миоклонической эпилепсии были выявлены разные потенциально патогенные мутации в гене *SV2A* как в семейных случаях, так и *de novo* [57–60]. Мутации выявлены как в гетерозиготном, так и в гомозиготном состоянии, часто с заменых аминокислот, и их наличие важно учитывать при выборе тактики лечения, поскольку продукт этого гена является мишенью для противоэпилептического препарата леветирацетама, наличие же мутаций снижает его эффективность.

Интерес для исследования представляет тяжелая форма миоклонической эпилепсии с фотоconvulsиями, известная как болезнь Лафора, встречающаяся у людей и собак [61]. Известно, что различные патогенные мутации гена *NHLRC1* приводят к накоплению в нейронах и астроцитах аномального нерастворимого гликогена в телах Лафора и присутствуют у большинства пациентов с этой болезнью [62]. У разных пород собак с данной болезнью также была выявлена ранее известная мутация в гене *NHLRC1* (или *EPM2B*), приводящая к увеличенному числу копий повторяющейся последовательности *NHL* в гене, и, как следствие, к нарушению функционирования кодируемого геном фермента.

ЭПИЛЕПСИЯ ЕДЫ

Эпилепсия, вызываемая приемом пищи, относится к редким подтипам РЭ, с расчетной распространенностью 0.05–0.1% от всех эпилепсий [63]. Большая часть этих случаев была зарегистрирована в Южной Азии, в частности на о. Шри-Ланка, что позволяет предположить связь пищевой эпилепсии с этническими факторами, такими как пища или пищевые привычки, либо с локальным накоплением мутаций [64]. Еда является

сложным триггером, поскольку задействует сенсорные, соматосенсорные и психические раздражители, поэтому рефлекторные судороги, провоцируемые приемом пищи, могут включать в себя большое многообразие задействованных механизмов. По локализации наиболее распространенными являются фокальные приступы с нарушением чувствительности. Точный механизм таких приступов остается неизвестным. Однако наличие семейных эпизодов и географическая локализация данного подтипа, а также описание в ряде работ очаговых структурных изменений в определенных областях мозга свидетельствуют о генетической этиологии данного подтипа РЭ.

В результате исследования случая с ранним дебютом приступов после приема пищи была идентифицирована крупная делеция в гетерозиготном состоянии, расположенная в диапазоне 15q25.3–15q26.1 и затрагивающая 83 гена [65]. Поскольку у пациента данная делеция была ассоциирована с множественными тяжелыми анатомическими патологиями, на данном случае пищевой РЭ трудно идентифицировать механизм, который запускает такие приступы. Тем не менее некоторые из делетированных генов, в частности *CHD2* и *POLG*, были ранее ассоциированы с другими типами эпилепсий [66, 67]. Кроме того, выше упоминалось, что *CHD2* является геном-кандидатом для предрасположенности к ФСЭ [48].

Представляет интерес обнаружение мутации в гене *SYNGAP1* у пациентов, страдающих эпилепсией жевания/приема пищи с фокальными приступами и миоклонией век [68]. Ранее мутации в данном гене были ассоциированы только с несколькими формами идиопатической генерализованной эпилепсии, аутизмом, умственной отсталостью, энцефалопатией и задержкой психомоторного развития [69]. Кроме того, в литературе зарегистрирован уникальный случай дупликации гена *MESCP2*, выявленный у пациента, имеющего только судороги, вызываемые приемом пищи [70]. При этом известно, что синдром дупликации *MESCP2* является самостоятельным заболеванием, связанным с X-хромосомой [71]. Данный тип РЭ выявлен также у нескольких пациентов с синдромом Ретта, развитие которого связано с мутацией в гене *MESCP2* [72]. Поскольку кодируемый этим геном метил-связывающий белок MeCP2 участвует в регуляции экспрессии многих генов, а также в процессинге микроРНК, то это создает сложности в выявлении сигнальных путей, нарушение которых приводит именно к возникновению эпилепсии еды при приеме пищи.

ЭПИЛЕПСИЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ВОДОЙ

Еще одной редкой формой эпилепсии является РЭ, в качестве триггера для которой выступает

контакт с водой. При этом можно условно выделить эпилепсию купания (ЭК), когда приступы провоцируются принятием душа, независимо от температуры воды, и эпилепсию горячей воды (ЭГВ), где обязательным условием является попадание горячей воды выше 40°C на голову [73, 74]. Отдельно можно выделить более редкие триггеры в виде мытья рук и чистки зубов. Из всех типов РЭ, связанных с водой, наибольшее распространение имеет ЭГВ, впервые описанная в 1945 г. в Новой Зеландии и наиболее часто встречающаяся в Турции и Индии с частотой около 6.9% [7, 74].

ЭГВ и ЭК довольно долгое время относили к одному типу РЭ. Однако позже было показано, что эти состояния имеют разную генетическую основу, клинику и сопутствующую симптоматику, что позволяет достоверно выделить их в отдельные подтипы [73]. Так, в одном исследовании у всех пациентов с историей ЭК (12 пациентов из десяти неродственных семей) были найдены мутации в гене *SYN1*, находящемся на X-хромосоме, восемь из которых характеризовались как патогенные. При этом ни у одного из десяти пациентов с ЭГВ в этом гене вариантов не было обнаружено. Представляет интерес то, что каждый из пациентов с ЭК в пределах семьи имел свою уникальную мутацию, по большей части либо патогенную, либо потенциально патогенную, восемь из которых были впервые выявленными и передались пробандам от матерей, а одна мутация была *de novo*. Таким образом, пациентов с ЭК и ЭГВ объединяет лишь то, что такие приступы встречаются чаще в детском и молодом возрасте, а триггером выступает вода, однако механизмы патогенеза, вероятно, разные.

Помимо гена *SYN1* у пациентов, страдающих ЭК, были выявлены мутации еще в нескольких генах, в частности, методом NGS была обнаружена *de novo* миссенс-мутация в гене *CACNA1A*, с322A>G; p.(Ile108Val), ранее описанная как потенциально патогенная для других форм эпилепсии, в том числе и для рефлекторных приступов вздрагивания [74, 75]. Изменения в данном гене, кодирующем компонент кальциевого канала и экспрессирующемся в основном в нейронах, могут потенциально способствовать возникновению ЭК [76]. У другого пациента с энцефалопатией, задержкой психомоторного развития и ЭК методом WES был обнаружен миссенс-вариант в гене *GNAO1*, с.607G>A; p.(Gly203Arg), мутации в котором ранее уже были описаны у лиц с эпилептической энцефалопатией и двигательными расстройствами [75, 78]. Возникновение рефлекторных приступов и их лекарственной устойчивости при нарушениях в функционировании *GNAO1* вероятно могут быть связаны с изменениями в трансмембранной передаче сигналов, пресинаптическом торможении и возбудимости нейронов. Еще в одном случае у пациента с ЭК методом

WES был выявлен *de novo*-вариант в гене *NOVA2*, с.826del; p.(Leu276Cysfs*120), приводящий к усечению его продукта [75]. Данный ген, экспрессируемый в ЦНС, участвует в регуляции альтернативного сплайсинга, и сдвиг рамки считывания или усечение продукта в результате мутации приводит к тяжелым неврологическим синдромам, аутизму и аномалиям головного мозга [79]. В случае же рефлекторных судорог, их причиной, вероятнее всего, может являться повышенная возбудимость коры в следствие гаплонедостаточности гена *NOVA2*. Еще одним геном, мутация в котором была выявлена у ребенка с ЭК, является локализованный на X-хромосоме ген *CDKL5*, кодирующий белок циклин-киназаподобный 5, необходимый для создания нейронных сетей в мозге [80]. Мутации в данном гене хорошо известны и, чаще всего, приводят к редкому генетическому заболеванию, известному как эпилептическая энцефалопатия 2-го типа. Таким образом, гены *CACNA1A*, *GNAO1*, *NOVA2* и *CDKL5* могут рассматриваться в качестве генов-кандидатов, мутации в которых могут быть ассоциированы с возникновением ЭК.

Другим типом РЭ, триггером которой выступает вода, является эпилепсия горячей воды. Точный механизм, задействованный при ЭГВ, остается неизвестным, но есть данные о том, что у пациентов из Саудовской Аравии с данным типом судорог приступы нельзя было купировать противоэпилептическими средствами, а избегание приступов достигалось снижением температуры воды [7].

Было выдвинуто предположение о связи ЭГВ с нарушением функции терморегуляторного центра, из-за чего пациенты испытывают быстрое повышение системной температуры тела, либо с запаздыванием тормозящих механизмов при сильном и резком воздействии на соматосенсорные рецепторы. В обоих случаях речь идет о дисфункции вегетативной нервной системы [81]. В этом плане ЭГВ можно сравнить с фебрильными судорогами у детей при подъеме температуры тела [82]. Тем не менее, была выявлена значимая ассоциация ЭГВ с двумя локусами, расположенными на хромосомах 4 и 10 в диапазонах 4q24–q28 и 10q21.3–q22.3 соответственно, с вероятным аутосомно-доминантным типом, у пациентов с ЭГВ из Южной Индии, где данный тип эпилепсии встречается с максимальной частотой [83, 84]. Однако поиск пока не выявил потенциальных генов-кандидатов, лежащих в данных областях генома и относящихся к ионным каналам, переносчикам или играющих важную роль в нейрогенезе.

К редким триггерам для РЭ, связанной с водой, относится чистка зубов и мытье рук [5, 85–87]. Для приступов, вызванных чисткой зубов, методом WES была найдена ранее не описанная нонсенс-мутация в 12-м экзоне гена *SYN1*, с.1807C>T (p.Q603Ter) у китайского пациента, а также его

родственников [85]. Биоинформатическими методами было предсказано, что данная мутация, скорее всего, приводит к укорачиванию нейроспецифического фосфопротеина с потерей его физико-химических свойств, поэтому была признана потенциально патогенной. Кроме того, рефлекторные приступы, возникающие в процессе мытья рук, были выявлены у ребенка с синдромом Пура, который обусловлен генетическими вариантами (мутации или микроделеции) в гене *PURA* на хромосоме 5 [86, 87]. В данном случае мутация также была выявлена в гене *PURA* с.783C>G p.[Tyr261*] и была ассоциирована с фенотипом, включающим в себя гипокинетически-ригидный синдром, являющийся частью клинической картины ранней стадии заболевания, и РП, состоящие из серии спазмов, вызванных мытьем рук [86].

ЭПИЛЕПСИЯ СНА

Аутосомно доминантная форма гипермоторной эпилепсии, связанная со сном (АДГЭСС), триггером которой выступает сон, это крайне редкая форма РЭ с гиперкинетическими фокальными приступами в фазу медленного сна, ранее известная как синдром ночной лобной эпилепсии, и встречающаяся с частотой около 1.8 на 10000 человек [88, 89]. Данное заболевание вызывает исследовательский интерес в связи со сложностью его дифференциальной диагностики от доброкачественных нарушений сна, и сложность купирования приступов у части пациентов. АДГЭСС встречается у лиц обоих полов и может дебютировать в любом возрасте, но чаще у детей и подростков. В 1995 г. в австралийской семье, члены которой страдали АДГЭСС, была впервые обнаружена миссенс мутация в гене *CHRNA4* с заменой аминокислоты серин на фенилаланин в кодирующей данным геном нейрональной альфа-4-субъединице никотинового ацетилхолинового рецептора [89]. В дальнейшем были найдены другие мутации в генах, кодирующих другие субъединицы данного рецептора, *CHRNA2* и *CHRNA2*, а также в том же гене *CHRNA4*, мутации в котором встречались в семейных случаях с ночной лобной эпилепсией [90]. Было высказано предположение, что данные мутации, изменяющие конформацию в трансмембранных областях белка, вероятно приводят к уменьшению кальций-зависимого ответа рецептора, либо к повышению его чувствительности к ацетилхолину [90]. При этом было выявлено благоприятное влияние никотина на купирование приступов, выявленных в случае мутаций данного типа генов, и это позволило предложить подходящую таргетную терапию в виде трансдермального введения никотина пациентам с мутациями в генах ацетилхолиновых рецепторов [91].

Позже для пациентов с АДГЭСС были обнаружены мутации в гене *KCNT1*, продукт которого принадлежит большому семейству белков калиевых каналов, что подтверждает предположение о генетической гетерогенности данного заболевания [92, 93]. Так, методом WES в данном гене у некоторых пациентов с АДГЭСС была обнаружена миссенс-мутация с.2782C>T (p.Arg928Cys), приводящая в том числе и к умственной отсталости, поведенческим и психическим расстройствам [92]. Кроме того, миссенс-мутации *de novo* в гене *KCNT1*, приводящие к замене аминокислот, были идентифицированы у младенцев со злокачественными мигрирующими парциальными приступами [93, 94]. Мутации отнесены к потенциально патогенным, поскольку функциональный анализ показал, что изменения в аминокислотах, которые вызывают мутации, могут приводить к усилению функционирования каналов во время деполяризации мембран и тем самым усиливать гипервозбудимость нейронов. Также, при исследовании некоторых спорадических случаев с АДГЭСС были обнаружены мутации в генах *DEPDC5* и *NPRL2*, кодирующих компоненты комплекса mTOR GATOR1, являющегося ключевым регулятором клеточного роста [95]. Так, мутации в гене *DEPDC5*, достигающие 5% от рассмотренных в исследовании случаев, приводили к сдвигу рамки считывания, что могло приводить к нарушениям в работе белка, являющегося ингибитором пути рапамицина (mTOR) [96]. Ранее мутации в этом гене были описаны в случае с семейной фокальной эпилепсией с варибельным очагом (FGEVF) [97]. Еще один кандидатный ген для ночной лобной эпилепсии был выявлен в исследовании двух спорадических случаев и пробандов из итальянской семьи, в ходе которого были описаны два новых нуклеотидных варианта в промоторе гена *CRH*, кодирующего кортикотропин-релизинг-гормон [98]. Функциональный анализ *in vitro* показал, что оба варианта изменяют уровень экспрессии белка. Расширение выборки пациентов с мутацией в этом гене и симптоматикой АДГЭСС позволило авторам предположить возможную корреляцию между изменениями экспрессии *CRH* и некоторыми особенностями течения заболевания, такими как возраст дебюта заболевания, ночные проявления судорог и типичная фрагментация сна.

Также методом WES в китайской семье с диагнозом АДГЭСС была выявлена новая миссенс-мутация в нейрональном гене *CABP4*, с.464G>A (p.G155D) [99]. Данный ген кодирует белок из семейства CABP кальций-связывающих белков, и мутации в этом гене приводят к врожденной стационарной ночной слепоте 2В-типа. С помощью биоинформатического анализа было предсказано, что данная мутация может изменять функцию белка. Авторы предположили, что нарушение функционирования гена *CABP4*, приводящее, веро-

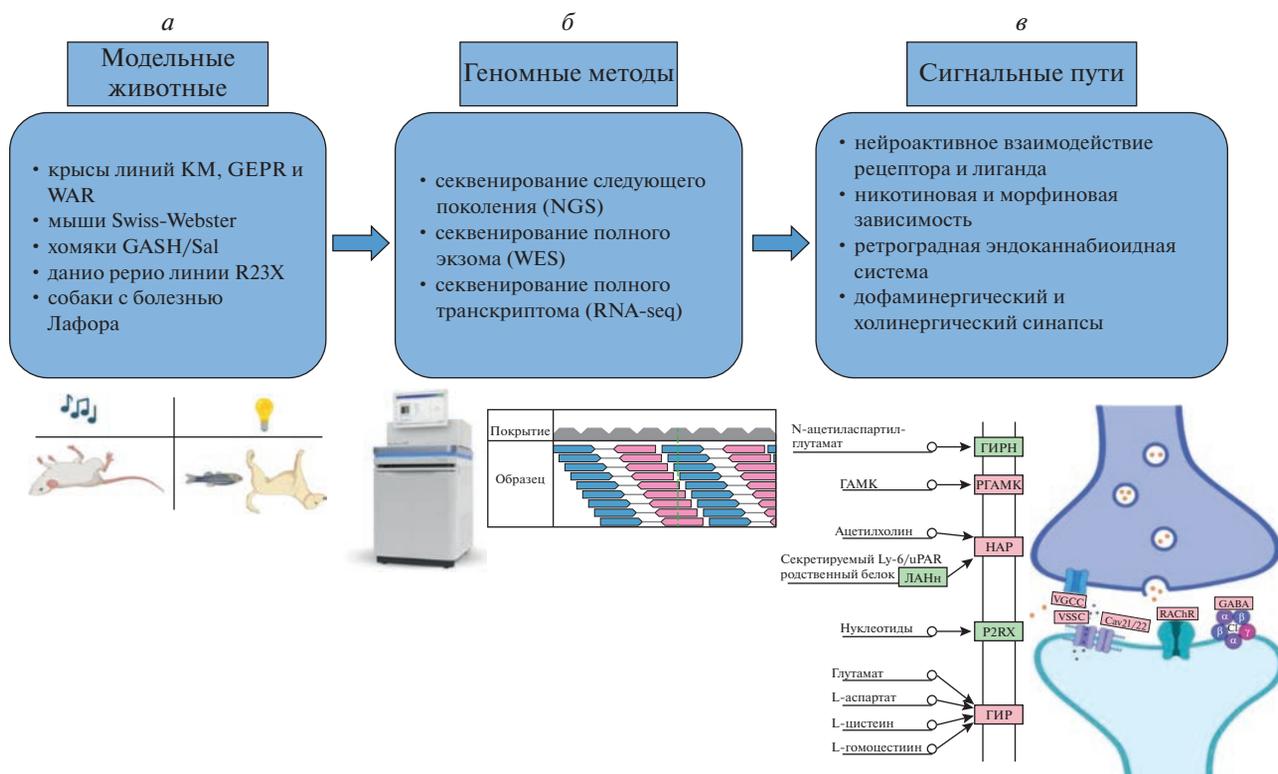


Рис. 1. Основные современные методы исследования генетических факторов рефлекторных эпилепсий. *а* – перечень основных модельных животных линий, используемых при исследовании генетических факторов РЭ, *б* – геномные методы, используемые для выявления генетических факторов, *в* – некоторые сигнальные пути, включающие в себя выявленные с помощью геномных методов кандидатные гены (ГИРН – глутаматный ионотропный рецептор НДМА, ГАМК – γ -аминомасляная кислота, РГАМК – рецептор глутамата и γ -аминомасляной кислоты, НАР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, P2RX – пуринергический рецептор, ГИР – глутаматный ионотропный рецептор, ЛА/Нн – лифоцитарный антиген/нейротоксин).

ятно, к снижению активации ионных каналов через нарушение высвобождения тормозящих нейротрансмиттеров, служит механизмом возникновения АДГЭСС.

РЕДКИЕ СЛУЧАИ РЕФЛЕКТОРНЫХ ЭПИЛЕПСИЙ, ВЫЗВАННЫХ ДРУГИМИ ТРИГЕРАМИ

К редким и малоизученным случаям РЭ относится аноксическая эпилепсия или аноксико-эпилептические приступы, характеризующиеся эпилепсией, вызванной отсутствием кислорода. Впервые данный термин был введен в 1983 г. [100]. Является одним из редких последствий детского рефлекторного гипоксического обморока [101]. В исследовании на пяти пациентах с аноксической эпилепсией впервые были выявлены *de novo* мутации в гене *SCN8A* [102]. Для генетических вариантов, найденных у двоих из них, ранее была показана связь с другими эпилептическими фенотипами, что позволяет предположить роль дополнительного генетического фактора, детер-

минирующего развитие именно аноксических приступов [103, 104].

Эпилептические приступы, провоцируемые чтением или первичная эпилепсия чтения (ЭЧ) – один из самых редких эпилептических синдромов. Частота встречаемости ЭЧ варьирует у народов, использующих разные системы письменности: максимальна для систем с буквенным написанием и минимальна для систем с иероглифическим, впервые была описана в 1956 г. [6]. Проводилось несколько исследований на монозиготных близнецах и в семьях с историей эпилепсии чтения, но не было выявлено генетических факторов, ассоциированных с этим заболеванием [78].

Список основных кандидатных генов, ассоциированных с рефлекторной эпилепсией и упомянутых в обзоре, представлен в табл. 1. Схематическое изображение современных методов исследования генетических факторов рефлекторных эпилепсий, примеры используемых животных моделей и сигнальных путей с обнаруженными генами-кандидатами представлено на рис. 1.

Таблица 1. Гены-кандидаты, представленные в современных исследованиях в качестве генетических факторов, участвующих в РЭ

Тип РЭ	Ассоциированные гены/локусы у человека			Выявленные гены/локусы на животных-моделях
	ген (при наличии)	полное название кодируемого белка (при наличии)	локус	
Аудиогенная эпилепсия	<i>GABRA1</i>	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	chr 5: 161.85–161.9 Mb	Мышь <i>Mus musculus</i> : <i>EGR3</i> , <i>GABRA1</i> , <i>MASSI</i> , <i>ASP1</i> , <i>ASP2</i> , <i>ADGRL1</i> , <i>FMRI</i> , <i>VGLUT2</i> , <i>CCL3</i> , <i>GRIN2A</i> , <i>FOSB</i> , <i>JUNB</i> , <i>FOS</i> , <i>LGII</i> Хомяк <i>Mesocricetus auratus</i> : семейство <i>EGR</i> , <i>Prestin</i> , <i>CDH23</i> , <i>PCDN15</i> , <i>VGLUT1</i> , <i>VGLUT2</i> , <i>ASB14</i> , <i>MSH3</i> , <i>ARHGEF38</i> , <i>CACNA1a</i> , <i>ZEB2</i> , <i>GRIKI</i> Крысы <i>Rattus norvegicus</i> : семейство <i>EGR</i> , <i>KCNJ16</i> , <i>OXT</i> , <i>VGLUT2</i> , <i>NR2B</i>
	<i>LGII</i>	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1	chr 10: 93.76–93.81 Mb	
	<i>SCN1A</i>	Sodium channel protein type 1 subunit alpha	chr 2: 165.98–166.15 Mb	
Фоточувствительная эпилепсия	<i>SCN1A</i>	Sodium channel protein type 1 subunit alpha	chr 2: 165.98–166.15 Mb	Курица <i>Gallus gallus</i> : <i>SV2A</i> Собака <i>Canis lupus familiaris</i> : <i>NHLRC1</i> Рыба <i>Danio rerio</i> : <i>GABRG2</i>
	<i>CHD2</i>	Chromodomain helicase DNA binding protein 2	chr 15: 92.9–93.03 Mb	
	<i>SYNGAP1</i>	Synaptic Ras GTPase-activating protein 1	chr 6: 33.42–33.45 Mb	
	<i>CSMD1</i>	CUB and sushi multiple domains 1	chr 8: 2.94–4.99 Mb	
	<i>STIM2</i>	Stromal interaction molecule 2	chr 4: 26.86–27.03 Mb	
	<i>RGS7BP</i>	Regulator of G protein signaling 7 binding protein	chr 5: 64.51–64.61	
	<i>RORB</i>	RAR related orphan receptor B	chr 9: 74.5–74.69 Mb	
			15q25.3–15q26.1	
			chr 6: 33.42–33.45 Mb	
			chr X: 47.57–47.62 Mb	
Эпилепсия еды	<i>SYNGAP1</i>	Synaptic Ras GTPase-activating protein 1	chr 6: 33.42–33.45 Mb	
	<i>SYN1</i>	Synapsin I	chr X: 47.57–47.62 Mb	
Эпилепсия купания/эпилепсия горячей воды	<i>PURA</i>	Purine rich element binding protein A	chr 5: 140.11–140.13 Mb	
	<i>CHRNA4</i>	Cholinergic receptor nicotinic alpha-4 subunit	chr 20: 63.34–63.38 Mb	
Эпилепсия сна	<i>SCN8A</i>	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 8	chr 12: 51.59–51.81 Mb	
Аноксическая эпилепсия				

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совокупность генетических данных, полученных при различных исследованиях рефлекторных эпилепсий, как на пациентах, так и на модельных животных, позволяет сделать вывод о том, что большая часть рефлекторных эпилепсий имеет сложную генетическую природу, и к одним и тем же симптомам могут приводить изменения, затрагивающие разные гены и разные механизмы. К основным молекулярно-генетическим факторам, которые вероятнее всего могут играть заметную роль в эпилептогенезе РЭ, относят каналопатию, возникающую в результате нарушения функционирования потенциалзависимых и рецепторных ионных каналов, дефектов в работе ферментов и регуляторных белков, а также мутаций в генах, кодирующих сигнальные адгезивные, цитоскелетные белки, компоненты репарации ДНК и мембранные транспортеры. Особого внимания заслуживают гены, меняющие свою экспрессию в нервной ткани. Кроме того, в реализации некоторых механизмов возникновения рефлекторных судорог задействованы, вероятно, провоспалительные медиаторы, ответственные за нейровоспаление.

Дальнейшие перспективы исследования генетических факторов, лежащих в основе рефлекторных эпилепсий, заключаются в объединении различных подходов, таких как омиксные технологии, геномное редактирование модельных животных для изучения реализации программы генотип-фенотип, а также применение оптогенетических методов анализа на животных-моделях с целью выявления участков мозга, наиболее затронутых при генезисе различного типа рефлекторных эпилептических приступов [105]. Эти подходы могут совместно обойти те ограничения, которые возникают при использовании отдельно каждого из них, и повысить эффективность поиска генов и механизмов, лежащих в основе патогенеза этого сложного и гетерогенного заболевания, что в свою очередь поможет в разработке новых стратегий лечения и профилактики, направленных на контроль над приступами и оптимизацию терапии пациентов с РЭ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер гранта 19-75-30039).

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. Fisher R.S., Acevedo C., Arzimanoglou A. et al. ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy // *Epilepsia*. 2014. V. 55. № 4. P. 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
2. Dorothee G.A., Trenité K.-N. Provoked and reflex seizures: Surprising or common? // *Epilepsia*. 2012. V. 53. P. 105–113. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03620.x>
3. Okudan Z.V., Özkara Ç. Reflex epilepsy: Triggers and management strategies // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2018. V. 14. P. 327–337. <https://doi.org/10.2147/NDT.S107669>
4. Koepp M.J., Caciagli L., Pressler R.M. et al. Reflex seizures, traits, and epilepsies: From physiology to pathology // *Lancet Neurol.* 2016. V. 15. № 1. P. 92–105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00219-7)
5. Holmes G.L., Blair S., Eisenberg E. et al. Tooth-brushing-induced epilepsy // *Epilepsia*. 1982. V. 23. № 6. P. 657–661. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1982.tb05081.x>
6. Bickford R.G., Whelan J.L., Klass D.W., Corbin K.B. Reading epilepsy: Clinical and electroencephalographic studies of a new syndrome // *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 1956. 81st Meeting. P. 100–102.
7. Syed R. Hot water epilepsy: A rare form of reflex epilepsy // *J. Neurosci. Rural Practice*. 2010. V. 1. № 2. P. 99–101. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.71724>
8. Wei F., Yan L.M., Su T. et al. Ion channel genes and epilepsy: Functional alteration, pathogenic potential, and mechanism of epilepsy // *Neurosci. Bull.* 2017. V. 3. № 4. P. 455–477. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0134-1>
9. Steinlein O.K. Genetics and epilepsy // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2008. V. 10. № 1. P. 29–38. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2008.10.1/oksteinlein>
10. Garbuz D.G., Davletshin A.A., Litvinova S.A. et al. Rodent models of audiogenic epilepsy: Genetic aspects, advantages, current problems and perspectives // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 11. P. 29–34. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112934>
11. Perucca P., Bahlo M., Berkovic S.F. The genetics of epilepsy // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2020. V. 21. P. 205–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120219-074937>
12. Wang J., Lin Z.J., Liu L. et al. Epilepsy-associated genes // *Seizure*. 2017. V. 44. P. 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.030>
13. Thakran S., Guin D., Singh P. et al. Genetic landscape of common epilepsies: Advancing towards precision in treatment // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 20. P. 77–84. <https://doi.org/10.3390/ijms21207784>
14. Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla G. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE commission for classification and terminology // *Epilepsia*. 2017. V. 58. № 4. P. 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
15. Chen Z., Brodie M.J., Liew D., Kwan P. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: A 30-

- year longitudinal cohort study // *JAMA Neurol.* 2018. V. 75. № 3. P. 279–286.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>
16. *Avanzini G.* Musicogenic seizures // *Ann. of the N. Y. Acad. of Sci.* 2003. V. 999. № 1. P. 95–102.
<https://doi.org/10.1196/annals.1284.008>
 17. *Critchley M.* Musicogenic epilepsy // *Brain.* 1937. P. 6013–6027.
 18. *Sanchez-Carpintero R., Patiño-Garcia A., Urrestarazu E.* Musicogenic seizures in Dravet syndrome // *Dev. Med. Child Neurol.* 2013. V. 55. P. 668–670.
<https://doi.org/10.1111/dmcn.12138>
 19. *Ding J., Li X., Tian H., Wang L. et al.* SCN1A mutation-beyond Dravet syndrome: A systematic review and narrative synthesis // *Front. Neurol.* 2021 V. 12. P. 743–726.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.743726>
 20. *Michelucci R., Gardella E., De Haan G.J. et al.* Telephone-induced seizures: A new type of reflex epilepsy // *Epilepsia.* 2004. V. 45. P. 280–283.
<https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.39703.x>
 21. *Michelucci R., Mecarelli O., Bovo G. et al.* A de novo LGI1 mutation causing idiopathic partial epilepsy with telephone-induced seizures // *Neurology.* 2007. V. 68. № 24. P. 2150–2151.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000264932.44153.3c>
 22. *Brodtkorb E., Michler R.P., Gu W., Steinlein O.K.* Speech-induced aphasic seizures in epilepsy caused by *lgi1* mutation // *Epilepsia.* 2005. V. 46. P. 963–966.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.47104.x>
 23. *Nobile C., Michelucci R., Andrezza S. et al.* LGI1 mutations in autosomal dominant and sporadic lateral temporal epilepsy // *Hum. Mutat.* 2009. V. 30. P. 530–536.
<https://doi.org/10.1002/humu.20925>
 24. *Chabrol E., Navarro V., Provenzano G. et al.* Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice // *Brain.* 2010. V. 133. P. 2749–2762.
<https://doi.org/10.1093/brain/awq171>
 25. *Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A. et al.* The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years // *Epilepsy Behav.* 2017. V. 71. P. 130–141.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.072>
 26. *Dailey J.W., Reigel C.E., Mishra P.K., Jobe P.C.* Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat // *Epilepsy Research.* 1989. V. 3. № 1. P. 3–17.
[https://doi.org/10.1016/0920-1211\(89\)90063-6](https://doi.org/10.1016/0920-1211(89)90063-6)
 27. *Garcia-Cairasco N., Umeoka E.H.L., Cortes de Oliveira J.A.* The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives // *Epilepsy & Behavior.* 2017. V. 71. Pt. B. P. 250–273.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.001>
 28. *Garcia-Gomes M.S.A., Zanatto D.A., Galvis-Alonso O.Y. et al.* Behavioral and neurochemical characterization of the spontaneous mutation tremor, a new mouse model of audiogenic seizures // *Epilepsy Behav.* 2020. V. 105.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106945>
 29. *Sánchez-Benito D., Hyppolito M.A., Alvarez-Morujó A.J. et al.* Morphological and molecular correlates of altered hearing sensitivity in the genetically audiogenic seizure-prone hamster GASH/Sal // *Hear. Res.* 2020. V. 392.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107973>
 30. *López-López D., Gómez-Nieto R., Herrero-Turrión M.J. et al.* Overexpression of the immediate-early genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures // *Epilepsy Behav.* 2017. V. 71. Pt. B. P. 226–237.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.020>
 31. *Díaz-Casado E., Gómez-Nieto R., de Pereda J.M. et al.* Analysis of gene variants in the GASH/Sal model of epilepsy // *PLoS One.* 2020. V. 15. № 3.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229953>
 32. *Chernigovskaya E.V., Korotkov A.A., Dorofeeva N.A. et al.* Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling // *Epilepsy Behav.* 2019. V. 99.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106494>
 33. *Chuvakova L.N., Funikov S.Yu., Rezyukh A.P. et al.* Transkriptome of the Krushinsky-Molodkina audiogenic rat strain and identification of possible audiogenic epilepsy-associated genes // *Front. Mol. Neurosci.* 2022. V. 14.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.738930>
 34. *Bertocchi I., Eltokhi A., Rozov A. et al.* Voltage-independent GluN2A-type NMDA receptor Ca²⁺ signaling promotes audiogenic seizures, attentional and cognitive deficits in mice // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. № 59.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01538-4>
 35. *Gonzalez D., Tomasek M., Hays S. et al.* Audiogenic seizures in the *Fmr1* Knock-Out mouse are induced by *Fmr1* deletion in subcortical, VGlut2-expressing excitatory neurons and require deletion in the inferior colliculus // *J Neurosci.* 2019. V. 39. № 49. P. 9852–9863.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0886-19.2019>
 36. *Skradski S.L., Clark A.M., Jiang H. et al.* A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy // *Neuron.* 2001. V. 31. P. 537–544.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00397-X](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00397-X)
 37. *Charizopoulou N., Lell A., Schradlers M. et al.* *Gipc3* mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. P. 201.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1200>
 38. *Petrova N.V., Marakhonov A.V., Balinova N.V. et al.* Genetic variant c.245A>G (p.Asn82Ser) in *GIPC3* gene is a frequent cause of hereditary nonsyndromic sensorineural hearing loss in Chuvash population // *Genes.* 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3390/genes12060820>
 39. *Garcia-Gomes M.S.A., Yamamoto P.K., Massironi S.M.G. et al.* Alteration of hippocampal *Egr3*, GABA A receptors, $\text{Il-1}\beta$, Il6 and *Ccl3* expression in audiogenic tremor mice after seizure // *Epilepsy Behav.* 2022. V. 137. (Pt. A).
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108962>
 40. *Padmanaban V., Inati S., Ksendzovsky A., Zaghoul K.* Clinical advances in photosensitive epilepsy // *Brain*

- Research. 2019. V. 1703. P. 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.07.025>
41. *Tauer U., Lorenz S., Lenzen K.P. et al.* Genetic dissection of photosensitivity and its relation to idiopathic generalized epilepsy // *Ann. Neurol.* 2005. V. 57. P. 866–873.
<https://doi.org/10.1002/ana.20500>
 42. *Stephani U., Tauer U., Koeleman B. et al.* Genetics of photosensitivity (photoparoxysmal response): A review // *Epilepsia.* 2004. V. 4. P. 19–23.
<https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.451008.x>
 43. *Manis A.M., Palygin O., Isaeva E. et al.* KCNJ16 knockout produces audiogenic seizures in the Dahl salt-sensitive rat // *JCI Insight.* 2021. V. 6. № 1.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.143251>
 44. *Pinto D., Westland B., de Haan C.-J. et al.* Genome-wide linkage scan of epilepsy-related photoparoxysmal electroencephalographic response: Evidence for linkage on chromosomes 7q32 and 16p13 // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 1. P. 171–178.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi018>
 45. *Gupta M., Polinsky M., Senephansiri H. et al.* Seizure evolution and amino acid imbalances in murine succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency // *Neurobiol. Dis.* 2004. V. 16. № 3. P. 556–562.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.04.008>
 46. *Dervent A., Gibson K.M., Pearl P.L. et al.* Photosensitive absence epilepsy with myoclonias and heterozygosity for succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency // *Clin. Neurophysiol.* 2004. V. 115. № 6. P. 1417–1422.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.01.002>
 47. *Liao M., Kundap U., Rosch R.E. et al.* Targeted knockout of GABA-A receptor gamma 2 subunit provokes transient light-induced reflex seizures in zebrafish larvae // *Dis. Model. Mech.* 2019. V. 12. № 11. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1242/dmm.040782>
 48. *Menon R.N., Nambiar P.N., Keni R.R. et al.* Drug-resistant “Non-Lesional” visual sensitive epilepsies of childhood – electroclinical phenotype-genotype associations // *Neurol. India.* 2021. V. 69. № 6. P. 1701–1705.
<https://doi.org/10.4103/0028-3886.333508>
 49. *Galizia E.C., Myers C.T., Leu C. et al.* CHD2 variants are a risk factor for photosensitivity in epilepsy // *Brain.* 2015. V. 138. № 5. P. 198–207.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv052>
 50. *Dorothee G.A., Trenité K.-N., Volkens L. et al.* Clinical and genetic analysis of a family with two rare reflex epilepsies // *Seizure.* 2015. V. 29. P. 90–96.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.03.020>
 51. *Crippa M., Malatesta P., Bonati M.T. et al.* A familial t(4;8) translocation segregates with epilepsy and migraine with aura // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2020. V. 7. № 5. P. 855–859.
<https://doi.org/10.1002/acn3.51040>
 52. *Shimizu A., Asakawa S., Sasaki T. et al.* A novel giant gene CSMD3 encoding a protein with CUB and sushi multiple domains: A candidate gene for benign adult familial myoclonic epilepsy on human chromosome 8q23.3–q24.1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 309. № 1. P. 143–154.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01555-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01555-9)
 53. *Sadleir L.G., de Valles-Ibáñez G., King C. et al.* Inherited RORB pathogenic variants: Overlap of photosensitive genetic generalized and occipital lobe epilepsy // *Epilepsia.* 2020. V. 61. P. e23–e29.
<https://doi.org/10.1111/epi.16475>
 54. *Liu H., Aramaki M., Fu Y., Forrest D.* Retinoid-related orphan receptor β and transcriptional control of neuronal differentiation // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2017. V. 125. P. 227–255.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.009>
 55. *Lo Barco T., Kaminska A., Solazzi R. et al.* SYNGAP1-DEE: A visual sensitive epilepsy // *Clin. Neurophysiol.* 2021. V. 132. № 4. P. 841–850.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2021.01.014>
 56. *Douaud M., Feve K., Pituello F. et al.* Epilepsy caused by an abnormal alternative splicing with dosage effect of the SV2A gene in a chicken model // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026932>
 57. *Calame D.G., Herman I., Riviello J.J.* A *de novo* heterozygous rare variant in SV2A causes epilepsy and levetiracetam-induced drug-resistant status epilepticus // *Epilepsy Behav. Rep.* 2021. V. 7. № 15.
<https://doi.org/10.1016/j.ebr.2020.100425>
 58. *Wang D., Zhou Q., Ren L., Lin Y. et al.* Levetiracetam-induced a new seizure type in a girl with a novel SV2A gene mutation // *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2019. V. 181. P. 64–66.
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2019.03.020>
 59. *Serajee F.J., Huq A.M.* Homozygous mutation in synaptic vesicle glycoprotein 2A gene results in intractable epilepsy, involuntary movements, microcephaly, and developmental and growth retardation // *Pediatr. Neurol.* 2015. V. 52. V. 6. P. 642–646.
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.02.011>
 60. *Van Vliet E.A., Aronica E., Redeker S. et al.* Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy // *Epilepsia.* 2009. V. 50. № 3. P. 422–433.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01727.x>
 61. *Von Klopmann T., Ahonen S., Espadas-Santiuste I. et al.* Canine Lafora disease: An unstable repeat expansion disorder // *Life (Basel).* 2021. V. 11. № 7.
<https://doi.org/10.3390/life11070689>
 62. *Araya N., Takahashi Y., Shimono M. et al.* A recurrent homozygous NHLRC1 variant in siblings with Lafora disease // *Hum. Genome. Var.* 2018. V. 5. P. 16.
<https://doi.org/10.1038/s41439-018-0015-9>
 63. *Girges C., Vijjaratnam N., Wirth T. et al.* Seizures triggered by eating – a rare form of reflex epilepsy: A systematic review // *Seizure.* 2020. V. 83. P. 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.09.013>
 64. *Seneviratne U., Seetha T., Pathirana R., Rajapakse P.* High prevalence of eating epilepsy in Sri Lanka // *Seizure.* 2003. V. 12. № 8. P. 604–605.
[https://doi.org/10.1016/s1059-1311\(03\)00110-9](https://doi.org/10.1016/s1059-1311(03)00110-9)
 65. *Vercellino F., Siri L., Brisca G. et al.* Symptomatic eating epilepsy: Two novel pediatric patients and review

- of literature // *Ital. J. Pediatr.* 2021. V. 47. № 1. P. 137. <https://doi.org/10.1186/s13052-021-01051-2>
66. *Suls A., Jaehn J.A., Kecskés A. et al.* De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 93. № 5. P. 967–975. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.017>
 67. *Rahman S., Copeland W.C.* POLG-related disorders and their neurological manifestations // *Nat. Rev. Neurol.* 2019. V. 15. № 1. P. 40–52. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0101-0>
 68. *Von Stülpnagel C., Hartlieb T., Borggräfe I. et al.* Chewing induced reflex seizures (“eating epilepsy”) and eye closure sensitivity as a common feature in pediatric patients with SYNGAP1 mutations: Review of literature and report of 8 cases // *Seizure.* 2019. V. 65. P. 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.12.020>
 69. *Agarwal M., Johnston M.V., Stafstrom C.E.* SYNGAP1 mutations: Clinical, genetic, and pathophysiological features // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2019. V. 78. P. 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.08.003>
 70. *De Palma L., Boniver C., Cassina M. et al.* Eating-induced epileptic spasms in a boy with MECP2 duplication syndrome: Insights into pathogenesis of genetic epilepsies // *Epileptic Disorders.* 2012. V. 14. № 4. P. 414–417. <https://doi.org/10.1684/epd.2012.0546>
 71. *Ramocki M.B., Peters S.U., Tavyev Y.J. et al.* Autism and other neuropsychiatric symptoms are prevalent in individuals with MeCP2 duplication syndrome // *Ann. Neurol.* 2009. V. 66. № 6. P. 771–782. <https://doi.org/10.1002/ana.21715>
 72. *Martínez A.R., Colmenero M.I.A., Pereira A.G. et al.* Reflex seizures in Rett syndrome // *Epileptic Disord.* 2011. V. 13. № 4. P. 389–393. <https://doi.org/10.1684/epd.2011.0475>
 73. *Accogli A., Wiegand G., Scala M. et al.* Clinical and genetic features in patients with reflex bathing epilepsy // *Neurology.* 2021. V. 97. № 6. P. 577–586. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012298>
 74. *Satishchandra P.* Hot-water epilepsy // *Epilepsia.* 2003. V. 44. P. 29–32. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.44.s1.14.x>
 75. *Krygier M., Zawadzka M., Sawicka A., Mazurkiewicz-Bełdzińska M.* Reflex seizures in rare monogenic epilepsies // *Seizure.* 2022. V. 97. P. 32–34. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2022.03.004>
 76. *Epi4K Consortium.* De novo mutations in SLC1A2 and CACNA1A are important causes of epileptic encephalopathies // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 99. № 2. P. 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.003>
 77. *Alehabib E., Esmaeilzadeh Z., Ranji-Burachaloo S. et al.* Clinical and molecular spectrum of P/Q type calcium channel Cav2.1 in epileptic patients // *Orphanet J. Rare Dis.* 2021. V. 16. P. 461. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-02101-y>
 78. *Danti F.R., Galosi S., Romani M. et al.* GNAO1 encephalopathy: Broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome // *Neurol. Genet.* 2017. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000143>
 79. *Mattioli F., Hayot G., Drouot N. et al.* De novo frame-shift variants in the neuronal splicing factor NOVA2 result in a common C-terminal extension and cause a severe form of neurodevelopmental disorder // *Am. J. Hum. Genet.* 2020. V. 106. № 4. P. 438–452. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.02.013>
 80. *Peikes T., Hartley J., Mhanni A. et al.* Reflex seizures in a patient with CDKL5 deficiency disorder // *Can. J. Neurol. Sci.* 2019. V. 46. № 4. P. 482–485. <https://doi.org/10.1017/cjn.2019.29>
 81. *Ullal G.R., Satishchandra P., Shankar S.K.* Hyperthermic seizures: An animal model for hot water epilepsy // *Seizure.* 1996. V. 5. № 3. P. 221–228. [https://doi.org/10.1016/s1059-1311\(96\)80040-9](https://doi.org/10.1016/s1059-1311(96)80040-9)
 82. *Fukuda M., Morimoto T., Nagao H., Kida K.* Clinical study of epilepsy with severe febrile seizures and seizures induced by hot water bath // *Brain Dev.* 1997. V. 19. № 3. P. 212–216. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(96\)00564-5](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(96)00564-5)
 83. *Ratnapriya R., Satishchandra P., Kumar S.D. et al.* A locus for autosomal dominant reflex epilepsy precipitated by hot water maps to chromosome 10q21.3-q22.3 // *Hum. Genet.* 2009. V. 125. P. 541–549. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0648-3>
 84. *Ratnapriya R., Satishchandra P., Dilip S. et al.* Familial autosomal dominant reflex epilepsy triggered by hot water maps to 4q24-q28 // *Hum. Genet.* 2009. V. 126. № 5. P. 677–683. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0718-6>
 85. *Zhou Q., Wang J., Xia L., Li R. et al.* SYN1 mutation causes X-linked toothbrushing epilepsy in a Chinese family // *Front. Neurol.* 2021. V. 20. № 12. 736977. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.736977>
 86. *Reijnders M.R.F., Janowski R., Alvi M. et al.* PURA syndrome: Clinical delineation and genotype-phenotype study in 32 individuals with review of published literature // *JMG.* 2017. V. 55. № 2. P. 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104946>
 87. *Solazzi R., Fiorini E., Parrini E. et al.* Early-onset bradykinetic rigid syndrome and reflex seizures in a child with PURA syndrome // *Epileptic Disord.* 2021. V. 23. № 5. P. 745–748. <https://doi.org/10.1684/epd.2021.1328>
 88. *Menghi V., Bissulli F., Tinupir F., Nobili L.* Sleep-related hypermotor epilepsy: Prevalence, impact and management strategies // *Nat. and Sci. of Sleep.* 2018. V. 10. P. 317–326. <https://doi.org/10.2147/NSS.S152624>
 89. *Tinuper P., Bisulli F., Cross J.H. et al.* Definition and diagnostic criteria of sleep-related hypermotor epilepsy // *Neurology.* 2016. V. 86. № 19. P. 1834–1842. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002666>
 90. *Steinlein O.K., Mulley J.C., Propping P. et al.* A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy // *Nat. Genet.* 1995. V. 11. № 2. P. 201–203. <https://doi.org/10.1038/ng1095-201>
 91. *Villa C., Colombo G., Meneghini S. et al.* CHRNA2 and nocturnal frontal lobe epilepsy: Identification and

- characterization of a novel loss of function mutation // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. V. 12. P. 17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00017>
92. *Brodtkorb E., Myren-Svelstad S., Knudsen-Baas K.M., et al.* Precision treatment with nicotine in autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy (ADSHE): An observational study of clinical outcome and serum cotinine levels in 17 patients // *Epilepsy Res.* 2021. V. 178. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106792>
93. *Heron S.E., Smith K.R., Bahlo M. et al.* Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. № 11. P. 1188–1190. [10.1038/ng.2440](https://doi.org/10.1038/ng.2440)
94. *Barcia G., Fleming M.R., Deligniere A. et al.* De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. № 11. P. 1255–1259. <https://doi.org/10.1038/ng.2441>
95. *Licchetta L., Pippucci T., Baldassari S. et al.* Sleep-related hypermotor epilepsy (SHE): Contribution of known genes in 103 patients // *Seizure.* 2020. V. 74. P. 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.11.009>
96. *Bar-Peled L., Chantranupong L., Cherniack A.D. et al.* A tumor suppressor complex with GAP activity for the rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1 // *Science.* 2015. V. 340. № 6136. P. 1100–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1232044>
97. *Dibbens L., de Vries B., Donatello S. et al.* Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. P. 546–551. <https://doi.org/10.1038/ng.2599>
98. *Combi R., Dalprà L., Ferini-Strambi L., Tenchini, M.L.* Frontal lobe epilepsy and mutations of the corticotropin-releasing hormone gene // *Ann. Neurol.* 2005. V. 58. P. 899–904. <https://doi.org/10.1002/ana.20660>
99. *Chen Z., Wang C., Zhuo M. et al.* Exome sequencing identified a novel missense mutation c.464G>A (p.G155D) in Ca²⁺-binding protein 4 (CABP4) in a Chinese pedigree with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 78940–78947. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20694>
100. *Horrocks I.A., Nechay A., Stephenson J.B.P. et al.* Anoxic-epileptic seizures: Observational study of epileptic seizures induced by syncopes // *Arch. Dis. Child.* 2005. V. 90. P. 1283–1287. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.075408>
101. *Appleton R.E.* Reflex anoxic seizures // *BMJ.* 1993. V. 24. № 307(6898). P. 214–215. <https://doi.org/10.1136/bmj.307.6898.214>
102. *Ranza E., Z'Graggen W., Lidgren M. et al.* SCN8A heterozygous variants are associated with anoxic-epileptic seizures // *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2020. V. 182A. P. 1209–1216. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61513>
103. *Anand G., Collett-White F., Orsini A. et al.* Autosomal dominant SCN8A mutation with an unusually mild phenotype // *EJPN.* 2016. V. 20. № 5. P. 761–765. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.04.015>
104. *Gardella E., Becker F., Möller R.S. et al.* Benign infantile seizures and paroxysmal dyskinesia caused by an SCN8A mutation // *Ann. Neurol.* 2016. V. 79. № 3. P. 428–436. <https://doi.org/10.1002/ana.24580>
105. *Cela E., Sjöström P.J.* Novel optogenetic approaches in epilepsy research // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00947>

Genetic Factors of Reflex Epilepsies

N. A. Dudko^{a, b, *}, S. S. Kunizheva^{a, b, c}, T. V. Andreeva^{a, b, c}, I. Yu. Adrianova^b, and E. I. Rogaeva^{a, c, d}

^aCenter for Genetics and Life Science, “Sirius” University of Science and Technology, Krasnodar region, pgt. Sirius, 354340 Russia

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cCenter for Genetics and Genetic Technologies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^dDepartment of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Worcester, MA, 01545 USA

*e-mail: dudko@rogaevlab.ru

Reflex epilepsy is a relatively rare form of epilepsy, occurring only in five percent of all cases of this disease. The genetic factors of reflex epilepsy are diverse and, in general, poorly studied. This review examines the main results obtained in recent years in the study of molecular genetic factors of reflex epilepsy, including new data on the mechanisms of genetic regulation in reflex epilepsy caused by triggers such as audio and video stimulation, food consumption, reading, contact with water and hypoxia. The results obtained in studies on animal models and patients using next-generation sequencing technology are presented.

Keywords: reflex epilepsy, genetic factors, audiogenic seizures, photosensitivity, hot water epilepsy.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ (*Brassica oleracea* L.) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ФУЗАРИОЗНОМУ УВЯДАНИЮ

© 2023 г. Е. В. Дубина^{1, 2, *}, Ю. А. Макуха¹, А. М. Артемьева³, Д. А. Фатеев³, С. В. Гаркуша¹, О. Л. Горун¹, С. А. Лесняк¹

¹Федеральный научный центр риса, Краснодар, пос. Белозерный, 350921 Россия

²Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар, 350044 Россия

³Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190031 Россия

*e-mail: lenakrug1@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

В настоящей статье приведены результаты исследований по определению информативных ДНК-маркерных систем, обеспечивающих надежный контроль наличия гена устойчивости к фузариозу *Foc I* в селекционном материале капусты белокочанной. На начальном этапе работ 14 молекулярных маркеров, взятых из базы данных VegMarks и литературных источников, были апробированы на контрастных по резистентности к фузариозу изогенных линиях капусты белокочанной (устойчивая линия ДТ-46 и восприимчивая линия Кб1П). Установлено, что InDel-маркер M10 и SSR-маркеры Frg13 и O110-D01 выявляют полиморфизм между контрастными образцами капусты белокочанной. Также проведен ПЦР-анализ на растениях сегрегирующей F₂ популяции гибридной комбинации ДТ-46 × Кб1П с помощью данных маркеров и выполнено фитопатологическое тестирование. В результате проведения статистического анализа расщепления обнаружено, что только SSR-маркер O110-D01 является сонаследуемым с признаком устойчивости к фузариозу, поскольку только по этому локусу наблюдается ожидаемая сегрегация растений F₂ по генотипу 1 : 2 : 1 согласно закону Менделя. Установлено, что наименьшая частота рекомбинации – между геном устойчивости *Foc I* и маркером O110-D01 (1.6%).

Ключевые слова: капуста белокочанная, фузариозное увядание, SSR-маркер, ПЦР-анализ, сегрегирующая популяция.

DOI: 10.31857/S001667582310003X, **EDN:** ZTYMZI

Капуста белокочанная является значимой овощной культурой семейства крестоцветных, возделываемой по всему миру. Одной из наиболее деструктивных болезней для данной культуры считается фузариозное увядание, вызываемое фитопатогенным грибом *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wollenweb.) [1]. Колонизация растения этим патогеном ведет к пожелтению листьев, увяданию, дефолиации (у старых растений), прекращению роста и, в конце концов, к гибели растения. В результате урожай претерпевает значительные потери. Теплая погода является благоприятным условием для развития болезни, и, учитывая растущие уровни производства культуры в регионах с умеренным климатом, эта болезнь становится настоящей проблемой [2, 3]. Глобальное потепление также может спровоцировать увеличение количества случаев заболевания фузариозом [4].

В последние годы фузариоз является наиболее распространенным заболеванием капусты на Кубани и поражает растения как в открытом, так и в защищенном грунте. Заболевание проявляется во всех фазах вегетации растения. В отдельные годы гибель растений от фузариоза может составлять 20–30% и более. Неустойчивые к патогену образцы выпадают от фузариоза практически полностью. Так например в 2010 г. фузариозом в Краснодарском крае поразилось более 30% сортов и гибридов капусты белокочанной отечественной и зарубежной селекции [5].

Традиционные методы защиты от фузариоза, такие как химический контроль или применение севооборота, почти не помогают в решении данной проблемы. Отмечено, что наиболее эффективным методом контроля болезни является выращивание устойчивых сортов [6, 7]. В последние годы при-

менение MAS (маркер-опосредованная селекция) в селекции капусты белокочанной на устойчивость к фузариозу является эффективным методом борьбы с данной болезнью. Особенно эффективным является применение ПЦР-анализа с использованием SSR- и InDel-маркеров [8–10]. Практика ведения селекционного процесса с применением молекулярных маркеров уже успешно используется на других важных сельскохозяйственных культурах (рис, перец [11], томаты [12] и др.).

Из литературных источников следует, что в настоящее время отсутствуют универсальные молекулярные маркеры для обеспечения высокой и надежной оценки по идентификации гена резистентности к фузариозу *Foc1* [13] в селекционном материале капусты белокочанной различного происхождения (отечественного и зарубежного). В связи с этим было принято решение о проведении исследования по определению информативных ДНК-маркерных систем для выявления гена устойчивости к *F. oxysporum* с целью ускорения и повышения эффективности селекционного процесса на устойчивость к фузариозному увяданию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили контрастные формы капусты белокочанной (устойчивая изогенная линия ДТ-46 и восприимчивая изогенная линия КБ1П) к фузариозу, а также 62 растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 × КБ1П, отобранные в отделе овощекртофелеводства ФГБНУ “ФНЦ риса”. ДНК из листьев капусты выделяли по схеме М. Мюррея и В. Томпсона [14] с использованием цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ) в качестве лизирующего буфера растительных клеток.

При проведении молекулярно-генетических исследований по идентификации аллелей устойчивости к фузариозу у капусты белокочанной применяли нейтральные кодоминантные микросателлитные (SSR) маркеры, взятые из базы данных VegMarks на сайте (<https://vegmarks.nivot.afrc.go.jp/VegMarks/app/page/home>), расположенные в шестой группе сцепления, где расположен ген устойчивости к фузариозу *Foc1*. Также при постановке ПЦР использовали кодоминантные InDel-маркеры A1 и M10 [13], кодоминантный SSR-маркер Frg13 [15], выявляющие высокий полиморфизм у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной, тесно сцепленные с геном устойчивости к фузариозу *Foc1* (0.6, 1.2, 0.1 сМ соответственно). Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров представлены в табл. 1.

Аmplификацию ДНК проводили в амплификаторах “Терцик” и “Bio Rad” с оптимизацией условий ПЦР. При апробации маркеров из базы

данных VegMarks использовали протокол амплификации с градиентом температуры отжига праймеров: первичная денатурация – 15 мин при 95°C; денатурация – 2 мин при 94°C; следующие 25 циклов: денатурация – 2 мин при 94°C, отжиг праймеров – 30 с при 65°C, синтез – 45 с при 72°C; затем каждый второй цикл температуру отжига понижают на 1°C до достижения температуры 55°C и остальные 20 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг праймеров – 30 с при 55°C, синтез – 45 с при 72°C, завершающий цикл синтеза – 1 мин при 72°C.

При проведении ПЦР с праймерами из работ [13, 15] опирались на следующую программу: первичная денатурация – 5 мин при 94°C, следующие 36 циклов: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг праймеров – 30 с при 55°C, элонгация – 45 с при 72°C; финальная элонгация – 7 мин при 72°C.

Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2%-ном агарозном (80 мин) и 8%-ном полиакриламидном геле (3 ч) при напряжении 130 и 240 В соответственно [16]. Визуализацию результатов электрофореза проводили в УФ-свете с использованием гелъдокументирующей системы GelDocXR+.

Для проведения фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу растения капусты белокочанной выращивали в пластиковых сосудах с почвой, предварительно зараженной водной суспензией гриба *F. oxysporum*, относящегося к расе 1 с титром конидий 10⁶ в 1 мл. Температура почвы при выращивании семян составляла 26–28°C. Оценку проявления болезни проводили через 21 день после появления всходов по четырехбалльной шкале, предложенной “ФНЦ риса” [5]. При подсчете результатов фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу растения с 2–3 баллами поражения считались неустойчивыми по фенотипу, а растения со степенью поражения 0–1 балл оценивали как устойчивые.

Для проведения оценки значимости различий в расщеплении в сегрегирующих популяциях между фактическим числом растений в выборке и теоретически ожидаемым использовали метод χ^2 (хи-квадрат) [17]. Частоту рекомбинации между геном устойчивости к фузариозу *Foc1* и молекулярными маркерами рассчитывали как отношение числа растений с наличием или отсутствием ДНК-маркера, несоответствующих фенотипическому проявлению признака устойчивости к фузариозу к общему числу растений, умноженное на 100 [18]. Анализ уровня полиморфизма использованных в работе молекулярных маркеров проводили путем расчета индекса полиморфного содержания (PIC) по формуле [19]: $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$, где P_i – частота встречаемости i -го аллеля.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для капусты белокочанной

№	Название маркера	Последовательности праймеров
1	BRMS-235	F – GGATCACAATCGTGTCTAGTAATC R – AGCATATCCATCAAGAGCTGGT
2	KBrH071B03R	F – AGACCGGCACGTATATTACCTGAA R – GTTTCATCGAGATCCGAGAAACGAAC
3	KBrB027H17F	F – AGCAGATTCATCAAGATCCAAAAC R – GTTCTTCAAGGCAAGGAAGATCAG
4	Na12-G11	F – TCAACAAAATCTAACCCAGTAAAGC R – TTCCTTGCCTTGAATCATCC
5	KBrB022L13F	F – AGATATCCGGATCCGTAAGTTTTA R – GTTTGTAATATCCCGATTTGCATCCT
6	BRMS-227	F – ACCATCTCGCTATTTATTTATGAAG R – GACGATTTGATAGAGGAAAGGAAT
7	KBrH101E14F	F – ATTGAAATCAAATCAAACCGCTC R – GTTTCATCCAACCACGTTTTACAGA
8	BRMS-252	F – ACTGGACTTATGTCTGAACAAGGAC R – CTGGCCAACATCAACATATAAACTA
9	BRMS-201	F – GTAATAACAGTTCTGCCTCTGCTC R – CTGCTGAATTAATTGCTGCTTCT
10	KBrH107C03R	F – ACAAGCTCTGTATTTTGGATTCGG R – GTTCCCCGAATAGTCTTTCCTTTTTCG
11	O110-D01	F – TCTCTGCCAAAAGCAAATAGC R – CTTGGCTCTCTCTACCACC
12	Frg13	F – ACCAGAGGCAGTTTTGGTTG R – TCTTGCAACCCATGTCAAAA
13	A1	F – TGACATAACCACTAGGAGCA R – GCAGAAGCTTTGATGAAGTT
14	M10	F – CACTTGCTCCAGTTTCTGTA R – AACTATGGATAAAAGGCGTG

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первый этап – проведение молекулярно-генетических исследований по выявлению информативных ДНК-маркерных систем для идентификации аллелей устойчивости к фузариозу. SSR-маркеры, взятые из базы данных VegMarks, расположенные в шестой группе сцепления, где находится ген устойчивости к фузариозу *Foc1* (1–11 маркер, табл. 1), были апробированы на контрастных по резистентности к фузариозу изогенных линиях капусты белокочанной. Из этих маркеров информативным оказался только O110-D01, результаты апробации которого представлены на рис. 1. На представленной электрофореграмме видна четкая аллельная разница между изучаемыми контрастными по устойчивости к фузариозу изогенными линиями. Размер устойчивого аллеля – 217 пн, неустойчивого – 184 пн.

На следующем этапе была проведена апробация двух кодоминантных InDel-маркеров (A1 и M10), выявляющих высокий полиморфизм у кон-

трастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной [13], и SSR-маркера Frg13, тесно сцепленного с геном устойчивости к фузариозу *Foc1* (0.1 cM) [15]. Результат электрофоретического разделения ПЦР-продуктов по данным маркерам представлен на рис. 2. Из рис. 2,а видно, что по маркеру A1 нет аллельной разницы между устойчивыми и неустойчивыми образцами, и их ДНК-профили одинаковы; для M10 у контрастных по устойчивости образцов наблюдаются полиморфные аллели. Из рис. 2,б видно, что у маркера Frg13 (близко расположенного к гену устойчивости к фузариозу *Foc1*) также наблюдается аллельная разница между контрастными формами. Следовательно, имело смысл изучить сонаследование данного маркера на сегрегирующей F₂-популяции по признаку устойчивости к фузариозу.

Далее отобранные ранее маркеры были апробированы на растениях F₂ сегрегирующей популяции гибридной комбинации ДТ-46 × К61П,

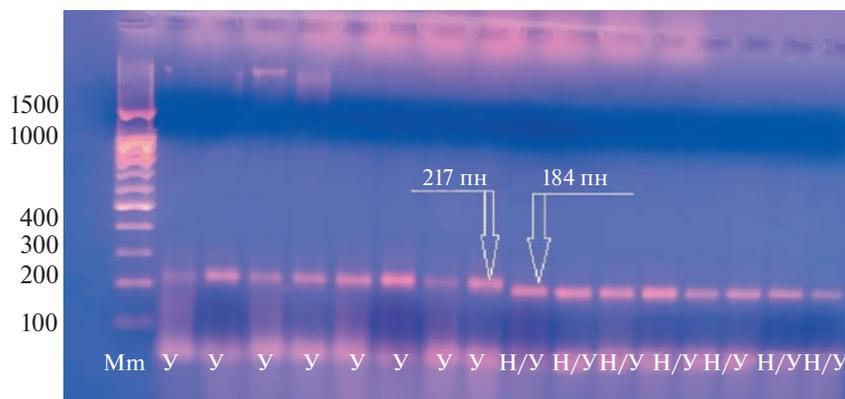


Рис. 1. Визуализация продуктов ПЦР по маркеру O110-D01 в 2%-ном агарозном геле. Mm – маркер молекулярной массы, У – изогенная устойчивая линия ДТ-46, Н/У – изогенная неустойчивая линия Кб1П.

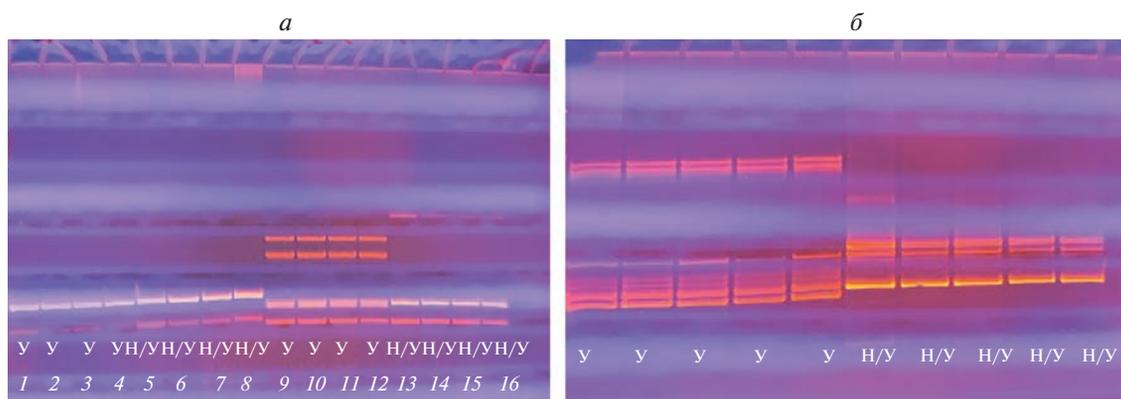


Рис. 2. Визуализация продуктов ПЦР по маркерам A1, M10 (а) и Frg13 (б) в 8%-ном полиакриламидном геле. Для рис. 2,а: У – изогенная устойчивая линия ДТ-46, Н/У – изогенная неустойчивая линия Кб1П, 1–8 – растения, анализируемые по маркеру A1, 9–16 – растения, анализируемые по маркеру M10. Для рис. 2,б: У – изогенная устойчивая линия ДТ-46, Н/У – изогенная неустойчивая линия Кб1П.

что отражено на рис. 3–5. На рис. 3 видно, что по локусу Frg13 не наблюдается расщепление растений по генотипу на гомо- и гетерозиготы, как это должно быть согласно второму закону Менделя, поэтому данный маркер не пригоден для ранжирования селекционных образцов капусты белокочанной по признаку устойчивости к фузариозу. При анализе электрофореграммы рис. 4 можно заметить, что уже среди первых проанализированных растений выявляется расщепление по генотипу, т. е. растения №№ 1, 2, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 16 имеют аллели восприимчивости размером 163 и 480 пн, растения №№ 3, 15 имеют в генотипе аллели устойчивости размером 344 и 388 пн, а растения №№ 4, 6, 7, 10 гетерозиготны. На рис. 5 видно, что по изучаемому маркеру растения №№ 33–35, 38, 47 несут в генотипе только аллель восприимчивости, растения №№ 39, 41, 42, 44 несут только донорный аллель устойчивости, а растения №№ 36, 37, 40, 43, 45, 46, 48 являются гетерозиготами.

В завершение молекулярно-генетических исследований был проведен анализ по наиболее информативным маркерам O110-D01, M10 всей выборки сегрегирующей популяции (62 растения) для установления окончательного соотношения по генотипу. Для изучения сонаследования отобранных маркеров с признаком устойчивости к фузариозу проводилось фитопатологическое тестирование растений F₂ гибридной комбинации ДТ-46 × Кб1П. Оценку поражаемости образцов проводили в динамике роста и развития растений по шкале, разработанной “ВНИИ риса” [5]. По результатам тестирования было установлено, что симптомы поражения фузариозом у растений сегрегирующей популяции капусты белокочанной соответствовали 1 и 2 баллам, т.е. наблюдалось только поражение отдельных листьев без остановки роста и гибели сеянцев, что отражено на рис. 6. На рис. 6,а видны пожелтение, увядание и усыхание семядольных листьев, что соответствует 1 баллу поражения. На 6,б помимо усыхания и

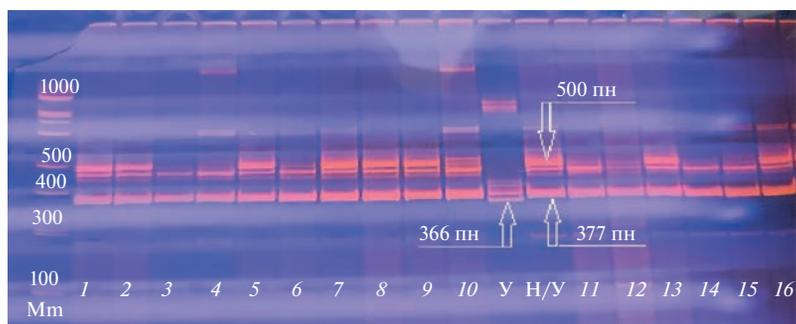


Рис. 3. Визуализация продуктов ПЦР по маркеру Frg13 в 8%-ном полиакриламидном геле. Mm – маркер молекулярной массы, 1–16 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 × К61П, У – изогенная устойчивая линия ДТ-46, Н/У – изогенная неустойчивая линия К61П.

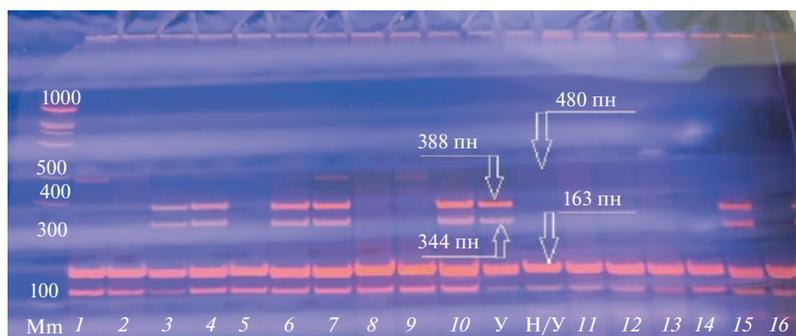


Рис. 4. Визуализация продуктов ПЦР по маркеру M10 в 8%-ном полиакриламидном геле. Mm – маркер молекулярной массы, 1–16 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 × К61П, У – изогенная устойчивая линия ДТ-46, Н/У – изогенная неустойчивая линия К61П.

увядания семядольных листьев наблюдается пожелтение настоящих листьев – 2 балла поражения по шкале “ВНИИ риса” [5].

На заключительном этапе исследования проводился сравнительный анализ результатов ДНК-анализа с использованием молекулярных маркеров (M10 и O110-D01), выявивших все типы аллельного состояния гена устойчивости к фузариозу у

растений F₂ с результатами фитопатологического тестирования (табл. 2). Из табл. 2 следует, что растения F₂ по маркеру O110-D01 имеют следующее соотношение по генотипу: 16 : 31 : 15, что соответствует менделевскому закону расщепления 1 : 2 : 1 и подтверждается статистическим анализом ($\chi^2 = 0.09 < \chi^2(\text{крит.}) = 5.99$), а по маркеру M10 – 9 : 17 : 36, что не удовлетворяет закону Менделя, так

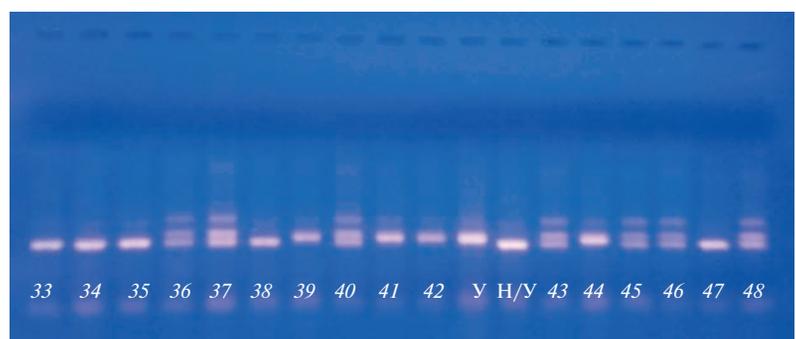


Рис. 5. Визуализация продуктов ПЦР по маркеру O110-D01 в 2%-ном агарозном геле. 33–48 – растения поколения F₂ гибридной комбинации ДТ-46 × К61П, У – изогенная устойчивая линия ДТ-46, Н/У – изогенная неустойчивая линия К61П.



Рис. 6. Симптомы поражения фузариозом, соответствующие одному баллу (а) и двум баллам поражения (б).

как ($\chi^2 = 33.69 > \chi^2(\text{крит.}) = 5.99$). Окончательное соотношение по фенотипу следующее: 48 (устойчивые) : 14 (неустойчивые), что удовлетворяет менделевскому 3 : 1, т.к. устойчивость к фузариозу имеет моногенный доминантный тип [20], и подтверждается методом хи-квадрат ($\chi^2 = 0.34 < \chi^2(\text{крит.}) = 3.84$).

Также была рассчитана частота рекомбинации между геном устойчивости к фузариозу и маркерами M10 и O110-D01 [18] и обнаружено, что наименьшая частота рекомбинации (1.6%) наблюдается у маркера O110-D01, а маркер M10 находится существенно дальше от целевого гена (45.1%) и не представляет существенного интереса. Таким образом, только маркер наследуется сцепленно с геном устойчивости к фузариозу, так как по этому локусу отсутствует ожидаемое при независимом наследовании расщепление 1 : 1 : 1 : 1 ($\chi^2 = 93.3 > \chi^2(\text{крит.}) = 7.81$), наблюдается сегрегация растений 1 : 2 : 1 согласно закону Менделя и наименьшая частота рекомбинации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам предыдущих исследований тип наследования устойчивости капусты белокочанной к фузариозу носит моногенный доминантный тип [10], что подтверждается и результатами проведенного в нашем исследовании фитопатологического тестирования на растениях сегрегирующей F_2 популяции. Апробированные в ходе молекулярно-генетических работ маркеры A1, M10, Frg13, тесно сцепленные с геном устойчивости к фузариозу *Foc1*, не показали должного высокого полиморфизма, какой наблюдается в работах Н. Lv и X. Liu [13, 15]. В наших исследованиях маркер A1 не выявляет аллельную разницу у контрастных по устойчивости к фузариозу образцов капусты белокочанной, Frg13 не выявляет гетерозиготы, а маркер M10, хоть и дифференцирует растения на гомо- и гетерозиготы в сегрегирующей популяции и имеет высокий индекс полиморфного содержания (PIC = 0.88), не удовлетворяет менделевскому закону, т. е. данный маркер

Таблица 2. Анализ сонаследования молекулярных маркеров среди растений сегрегирующей популяции F_2

ДНК-маркер	F ₂ – растения гибридной комбинации ДТ-46 × К61П									Частота рекомбинации, %
	сегрегация растений по генотипу		сегрегация растений по фенотипу		Маркер/устойчивость к фузариозу					
	+ : ± : –	χ^2	R : S	χ^2	R/+	S/+	R/–	S/–	χ^2	
O110-D01	16 : 31 : 15	0.09	48 : 14	0.34	47	0	1	14	93.3	1.6
M10	9 : 17 : 36	33.69			23	3	25	11	20.8	45.1

Примечание. R – устойчивость, S – неустойчивость, “+” – присутствует молекулярный маркер, “–” – отсутствует молекулярный маркер. Для уровня значимости $p = 0.05$ и $d.f. = 1$ критическое значение $\chi^2(\text{крит.}) = 3.84$, для $d.f. = 2$ $\chi^2(\text{крит.}) = 5.99$, а для $d.f. = 3$ $\chi^2(\text{крит.}) = 7.81$.

не наследуется с признаком резистентности к фузариозу.

Полученные данные указывают на необходимость более тщательного подбора молекулярных маркеров, которые бы были универсальны и могли бы достоверно идентифицировать ген устойчивости на селекционном материале различного происхождения. На основании результатов проведенных нами молекулярно-генетических исследований, фитопатологического тестирования и статистического анализа, можно сделать вывод, что только SSR-маркер O110-D01 является информативным кодоминантным маркером, наследуемым с признаком устойчивости к фузариозу и высокополиморфным (PIC = 0.51). Он будет включен в селекционный процесс для ускоренного создания устойчивых генотипов капусты белокочанной к фузариозу на юге России. Такие растения будут обладать повышенной урожайностью и нужными морфометрическими характеристиками, которые позволят решить проблему импортозамещения и получения продуктов здорового питания (экологически безопасной продукции, выращенной с применением пониженного количества средств химической защиты).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда, ФГБНУ «Федерального научного центра риса» в рамках научного проекта № МФИ-П-20.1/41.

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. Pu Z., Shimizu M., Zhang Y. et al. Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene in *Brassica oleracea* // Mol. Breed. 2012. № 30. P. 809–818. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9665-8>
2. Bosland P.W., Williams P.H., Morrison R.H. Influence of soil temperature on the expression of yellows and wilt of crucifers by *Fusarium oxysporum* // Plant Dis. 1988. № 72. P. 777–780. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0777>
3. Farnham M.W., Keinath A.P., Smith J.P. Characterization of fusarium yellows resistance in collard // Plant Dis. 2001. № 85. P. 890–894. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.890>
4. Berrocal-Lobo M., Molina A. Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum* // Trends Plant Sci. 2007. № 13. P. 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.12.004>
5. Королева С.В., Дякунчик С.А., Ситников С.В. Иммунологическая оценка селекционного материала при создании гибридов F1 белокочанной капусты с групповой устойчивостью к фузариозу и сосудистому бактериозу (методические рекомендации). М.: 2012. 16 с.
6. Arden S. Fusarium Yellows of Cabbage and Related Crops. N.Y.: Vegetable Crops, 1979. 730 p.
7. Keinath A.P., Farnham M.W., Smith P. Reactions of 26 cultivars of *Brassica oleracea* to yellows in naturally infested soil // Biol. Cult. Tests. 1998. № 13. 155 p.
8. Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts // Euphytica. 2005. № 142. P. 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
9. Vali U., Brandstrom M., Johansson M., Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations // BMC Genetic. 2008. № 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-8>
10. Lv H. Fang Z., Yang L. et al. Research on screening of resistant resources to fusarium wilt and inheritance of the resistant gene in cabbage // Acta Horticult. Sinica. 2011. V. 5. № 38. P. 875–885. <https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2011.05.001>
11. Дубина Е.В. ДНК-технологии (молекулярное маркирование) в селекции риса и семеноводстве овощных культур: Дис. ... д-ра биол. наук. Краснодар: ВНИИ риса, 2019. 275 с.
12. Фесенко И.А., Куклев М.Ю., Карлов Г.И. Создание ДНК-маркера устойчивости томата к фузариозному увяданию // Известия ТСХА. № 1. 2007. С. 66–72.
13. Lv H., Yang L., Kang J. et al. Development of InDel markers linked to fusarium wilt resistance in cabbage // Mol. Breed. 2013. V. 32. P. 961–967. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9925-x>
14. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Ac. Res. 1980. V. 10. P. 4321–4325.
15. Liu X., Han F., Kong C. Rapid introgression of the fusarium wilt resistance gene into an elite cabbage line through the combined application of a microspore culture, genome background analysis, and disease resistance-specific marker assisted foreground selection // Front. in Plant Sci. 2017. V. 8. Article 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00354>
16. Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений. Екатеринбург, 2017. 142 с.
17. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных. Минск, 2008. 160 с.
18. Нгуен М.Л., Монахос Г.Ф., Комахин Р.А., Монахос С.Г. Новый локус устойчивости к киле в хромосоме A05 капусты пекинской (*Brassica rapa* L.) // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 306–315.
19. Аджиева В.Ф., Некрашевич Н.А., Малышев С.В. и др. Сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных маркеров генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) белорусской и зарубежной селекции // Мол. и прикладная генетика. 2010. Т. 11. С. 7–11.
20. Ramirez-Villapadua J., Endo R.M., Bosland P., Williams P.H. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage with type A resistance // Plant Dis. 1985. № 69. P. 612–613.

Molecular Marking in *Brassica oleracea* L. Breeding for Resistance to Fusarium Wilt

**E. V. Dubina^{a, b, *}, Yu. A. Makukha^a, A. M. Artem'eva^c, D. A. Fateev^c,
S. V. Garkusha^a, O. L. Gorun^a, and S. A. Lesnyak^a**

^a*Federal Scientific Rice Centre, Krasnodar, 350921 Russia*

^b*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, 350004 Russia*

^c*Federal Research Centre Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources,
Saint-Petersburg, 190031 Russia*

**e-mail: lenakrug1@rambler.ru*

This article presents the results of research on the identification of informative DNA marker systems, providing reliable control of the resistance gene to fusarium wilt *Foc1* presence in white cabbage breeding material. At the beginning of the work 14 molecular markers, taken from VegMarks database and literature sources were tested on isogenic white cabbage lines with contrasting resistance to fusarium wilt (resistant line DT-46 and susceptible line Kb1P). InDel-marker M10 and SSR-markers Frg13 and O110-D01 have been ascertained to show polymorphism between white cabbage forms with contrasting resistance to fusarium wilt. Also PCR-analysis of segregating F₂-population plants of hybrid combination DT-46 × Kb1P using these markers and phytopathology testing have been conducted. As a result of statistical analysis of segregation it has been found that SSR-marker O110-D01 only is cosegregated with the trait of resistance to fusarium wilt as expected segregation of F₂-plants by genotype 1 : 2 : 1 according to Mendel's law, the least recombination frequency between the resistance gene *Foc1* and the marker (1.6%) has just been observed by this locus only and highly polymorphic (PIC = 0.51).

Keywords: white cabbage, fusarium wilt, SSR-marker, PCR-analysis, segregating population.

**ФИЛОГЕНИЯ РОДА *Eleginus* (Gadidae) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА
ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
И ФРАГМЕНТА *COI* мтДНК**

© 2023 г. А. Н. Строганов^{1, *}, Е. В. Пономарева¹, М. В. Пономарева¹, Е. А. Шубина¹,
К. А. Жукова¹, А. А. Смирнов^{2, 3}, Т. А. Ракицкая⁴, М. В. Ракитина⁵

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО),
Москва, 107140 Россия

³Северо-Восточный государственный университет, Магадан, 685000 Россия

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

⁵Магаданский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии
(МагаданНИРО), Магадан, 685000 Россия

*e-mail: andrei_str@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2023 г.

После доработки 05.06.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Генетическими методами на основе исследования изменчивости митохондриальной (*COI*) и ядерной (микросателлиты) ДНК проводили исследования процессов формообразования в роде *Eleginus*. Выявленный уровень генетической дифференциации характеризует тихоокеанскую навагу (*Eleginus gracilis*) и северную навагу (*Eleginus nawaga*) как самостоятельные виды, дивергировавшие в относительно недавний период на границе плиоцена и плейстоцена. В группировке северной наваги отмечена внутривидовая дифференциация популяции Белого моря по отношению к наваге, обитающей в акваториях Карского и Баренцева морей. При этом предполагается, что карско-баренцевоморский регион мог выступать в качестве “ледникового рефугиума”, обеспечившего послеледниковое расселение наваги, в том числе в “оводнившуюся” беломорскую депрессию. Результаты проведенного филогенетического анализа на основе гаплотипов *COI* предполагают возможную реорганизацию в отряде Gadiformes в плане рассмотрения перспектив включения рода *Eleginus* в отдельное подсемейство.

Ключевые слова: атлантическая навага, тихоокеанская навага, микросателлитные локусы, *COI*, таксономический статус.

DOI: 10.31857/S0016675823100120, **EDN:** ZWSXQJ

Представители рода *Eleginus* населяют прибрежные акватории Северной Атлантики, Северной Пацифики, Северного Ледовитого океана. Род представлен двумя аллопатрическими видами. Тихоокеанская навага *Eleginus gracilis* (Tilesius, 1810) в северной части Тихого океана распространена от Берингова пролива на севере и на юг вдоль обоих побережий: вдоль азиатского побережья до Японского моря (ограниченно присутствует также в Желтом море), а по североамериканскому побережью – до о. Ситкэ. В Северном Ледовитом океане тихоокеанская навага распространена в морях Чукотском и Бофорта. Северная навага *Eleginus nawaga* (Walbaum, 1792) обитает на восток от Кольского залива Баренцева моря и до Хатангского залива моря Лаптевых, а также распространена в Белом море [1–3]. В отличие от тихоокеанской

наваги А. Андрияшев и Н. Чернова относят северную навагу к арктическим видам, основываясь, видимо, на формировании промысловых скоплений в осенне-зимний период, ее нересте и длительном эмбрионально-личиночном развитии при отрицательных температурах [4]. При этом, в литературе присутствует информация о предпочтении северной навагой в период откорма вод с положительными значениями температур. Так, в летний нагульный период она питается и растет при температурах до 18–20°C [5, 6]. Интересно отметить, что в аквакультуре рыб, которые питаются и растут при таких температурах относят к тепловодным [7]. Учитывая все же температурный оптимум северной наваги в пределах от 0 до 12°C [8], видимо, следует относить ее, как и тихоокеанскую навагу, к бореальным видам.

Оба представителя рода *Eleginus* являются ценными объектами промысла, хотя объемы вылова относительно невелики. Так тихоокеанской наваги в начале 2000-х гг. добывали в пределах 36 тыс. т, северной наваги ловили значительно меньше — всего 0.67 тыс. т.

Исследовательский интерес к наваге имеет многолетнюю историю — изучались ее биологические, морфологические характеристики на различных этапах онтогенеза [1, 8–14]. При этом объем генетических данных для представителей рода *Eleginus* достаточно низкий. Известна проведенная на основе исследования изменчивости микросателлитных локусов ядерной ДНК публикация [15], где с использованием только одной выборки северной наваги (Баренцево море) и двух выборок тихоокеанской наваги (Северная Пацифика, залив Аляска; Северный Ледовитый океан, Чукотское море) оценивали уровень дифференциации таксонов внутри рода *Eleginus*. Что касается использования микросателлитных локусов в межвидовых исследованиях, то существует мнение, что, несмотря на имеющиеся ограничения (ноль-аллели, гомоплазия), такие преимущественные характеристики микросателлитов, как легкость типизации, кодоминантность, достаточно высокая частота мутаций, селективная нейтральность и др. действительно дают возможность их использования даже и при сравнениях между таксонами [16, 17].

В связи с небольшим количеством генетических исследований рода *Eleginus* важным является как изучение популяционной структуры, так и рассмотрение систематического положения с использованием филогенетических методов. Для рыб при видовой идентификации дает надежные результаты и широко применяется участок гена *COI* мтДНК. Для большинства видов рыб накоплено и доступна для сравнительных исследований информация в базах нуклеотидных последовательностей GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) и BOLD (http://boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Home), в которых содержится и небольшое количество записей для рода *Eleginus*, в основном для тихоокеанской наваги.

Цель настоящей работы — изучение особенностей полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК у представителей рода *Eleginus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для выполнения данной работы послужили выборки наваги из акваторий Охотского, Карского, Баренцева, Белого морей, собранные в комплексных экспедициях МГУ, МагаданНИРО, ЦМИ в период с 2005 по 2019 гг. В рамках проведения сравнительных исследований использованы выборки атлантической трески

(*Gadus morhua*) и тихоокеанской трески (*Gadus macrocephalus*), применявшиеся также в наших ранее опубликованных работах [18, 19]. Информация об использованных выборках представлена в табл. 1.

В качестве маркеров использовали секвенированные для атлантической трески (*G. morhua*) и амплифицирующиеся у представителей рода *Eleginus*, микросателлитные локусы *PGmo32*, *Gmo8*, *Gmo-G18*, *Gmo34*, *Gmo35*, *Gmo3* [20], применяемые в исследованиях макро- и микроэволюционных процессов у рыб [21, 22]. Использование в нашем случае секвенированных для атлантической трески микросателлитных локусов вполне оправдано, с одной стороны, наличием нашего опыта успешного применения данных маркеров к представителям семейства Gadidae [23, 24], а с другой стороны, публикациями известных авторов, ранее подобным образом применивших микросателлитные локусы в рамках семейств Ophidiidae, Gadidae, Cichlidae [25–28].

Для ПЦР-амплификации использовали наборы Gene Pak PCR Core (ООО “ИзоГен”, Россия). Амплификацию микросателлитных локусов проводили в термоциклере “MJ Research PTC100”. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы “1D Image Analysis Software Version 3.5” (“Codak”). Исследование проводили в соответствии с протоколом [23, 29].

Частоты аллелей, равновесие Харди–Вайнберга, гетерозиготность ожидаемая (H_E) и наблюдаемая (H_O) [30], коэффициент попарного сходства (дифференциации) популяций θ , уровень гетерогенности и другие показатели определяли с использованием программного пакета GDA (достоверными принимаются значения θ со значениями 95%-ного доверительного интервала выше 0) [31]. Генетическую идентичность (I) рассчитывали по методу Нея [32] в GDA. Достоверность отличий H_E и H_O оценивали с помощью F -критерия Фишера [33]. Оценки аллельного разнообразия (A_r), скорректированные по минимальному размеру выборки, были получены в программе FSTAT 2.9.3 (<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>) [34]. Для расчета попарных значений F_{ST} и P на основе пермутационного теста с параметрами по умолчанию (999 итераций) использовали программный пакет GenAlEx 6.502 [35]. В этом же пакете проводили анализ популяционной структуры методом главных координат (PCoA) на основе ковариационной матрицы генетических дистанций и визуализацию матрицы попарных F_{ST} -значений.

Исследование последовательностей фрагмента гена *COI* проводили в соответствии с протоко-

Таблица 1. Характеристика исследованного материала и генетическая изменчивость в выборках Gadidae по микросателлитным локусам

Район сбора	Координаты		N	Обозначение	Показатели	Локусы					
	широта	долгота				Gmo32	Gmo8	Gmo18	Gmo34	Gmo35	Gmo3
<i>Eleginus nawaga</i>											
Белое море, Кандалакшский залив, ББС, июль 2011 г.	66°55'35" с.ш.	33°10'32" в.д.	48	EnWS1	A	2	2	2	6	2	2
					Ho	0.125	0.021	0.083	0.543	0.354	0.104
					He	0.117	0.021	0.080	0.543	0.364	0.099
					P	0.644	0.942	0.763	0.999	0.846	0.703
Белое море, Кандалакшский залив, ББС, июль 2015 г.	66°55'35" с.ш.	33°10'32" в.д.	43	EnWS2	A	2	1	3	7	2	3
					Ho	0.047	—	0.535	0.535	0.231	0.070
					He	0.045	—	0.435	0.548	0.242	0.068
					P	0.876	—	0.267	0.000***	0.767	0.997
Карское море, о. Белый, 27.07.2019	73°12'39" с.ш.	69°58'45" в.д.	20	EnKS	A	1	1	3	6	2	2
					Ho	—	—	0.100	0.400	0.400	0.100
					He	—	—	0.096	0.514	0.420	0.095
					P	—	—	0.997	0.003**	0.831	0.814
Баренцево море, о. Долгий, 12.07.2019	69°17'56" с.ш.	58°49'37" в.д.	22	EnBS	A	2	1	2	7	2	3
					Ho	0.045	—	0.045	0.682	0.364	0.182
					He	0.044	—	0.044	0.612	0.298	0.168
					P	0.913	—	0.913	0.836	0.297	0.974
<i>Eleginus gracilis</i>											
Охотское море, Тауйская губа, зал. Амахтонский, 03.06.2019	59°57'6" с.ш.	149°58'13" в.д.	27	EgrOS2	A	1	3	2	5	2	2
					Ho	—	0.053	0.026	0.842	0.053	0.158
					He	—	0.052	0.026	0.722	0.051	0.145
					P	—	0.999	0.934	0.880	0.868	0.597

Таблица 1. Окончание

Район сбора	Координаты		N	Обозначение	Показатели	Локусы						
	широта	долгота				Gmo32	Gmo8	Gmo18	Gmo34	Gmo35	Gmo3	
Охотское море, Тауйская губа, залив Одян, 12.03.2012	59°12'58" с.ш.	151°51'50" в.д.	38	EgrOS3	A	2	3	2	10	1	2	
					Ho	0.040	0.080	0.020	0.714	—	0.100	
					He	0.039	0.077	0.020	0.730	—	0.130	
					P	0.885	0.993	0.943	0.000***	—	0.101	
<i>Gadus macrocephalus</i>												
Охотское море, Западная Камчатка траверз устья р. Бол. Воровская, 08.11.2005	54°13'42" с.ш.	154°42'42" в.д.	25	GmacOS1	A	4	30	2	17	3	2	
					Ho	0.375	0.958	0.042	0.960	0.080	0.040	
					He	0.318	0.958	0.041	0.906	0.150	0.039	
					P	0.973	0.364	0.917	0.914	0.015*	0.919	
Охотское море, Зап. Камчатка траверз устья р. Бол. Воровская, 08.11.2005	54°13'42" с.ш.	154°42'42" в.д.	25	GmacOS2	A	4	30	2	16	2	1	
					Ho	0.476	0.952	0.095	0.957	0.043	—	
					He	0.408	0.958	0.091	0.896	0.043	—	
					P	0.514	0.303	0.819	0.885	0.915	—	
<i>Gadus morhua</i>												
Баренцево море, Мурманское мелководье, 19.08.2005	69°40'01" с.ш.	43°40'05" в.д.	30	GmoBS1	A	3	23	2	4	8	4	
					Ho	0.267	0.900	0.533	0.100	0.793	0.200	
					He	0.238	0.920	0.491	0.127	0.802	0.242	
					P	0.871	0.004**	0.638	0.000***	0.990	0.345	
Баренцево море, Канинская банка, 15.08.2005	70°01'56" с.ш.	38°09'37" в.д.	28	GmoBS2	A	4	21	3	4	8	4	
					Ho	0.407	0.926	0.607	0.286	0.778	0.179	
					He	0.448	0.925	0.513	0.314	0.785	0.168	
					P	0.057	0.039*	0.739	0.356	0.947	1.000	

Примечание. N – объем выборки, A – число аллелей, Ho – ожидаемая гетерозиготность, He – наблюдаемая гетерозиготность, P – вероятность соответствия равновесию Харди – Вайнберга. * Статистически значимое отклонение от равновесия Харди – Вайнберга, без учета поправки на множественность тестов.

лом, описанным в работе Е. Пономаревой с соавт. [36]. Первичную обработку и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе Geneious® 6.0.5 (Biomatters Ltd.), определение количества гаплотипов (H), разнообразия гаплотипов (Hd), разнообразия нуклеотидов (Pi) проводили в программах FaBox [37], DnaSP v.5 [38]. Двухпараметрическая модель замен Кимуры K2P [39] была применена для расчета матрицы средних попарных дистанций между видами, данная модель замен используется в проекте BOLD [40]. Для построения дистанционной матрицы использовали программу Mega X [41]. Байесовский информационный критерий (BIC) был применен для определения наилучшей модели замен [42]. Модель НКУ + G была применена для построения деревьев: методом присоединения соседей (NJ) с бутстреп поддержкой (10000 итераций) в программе Mega X [41], в этой же программе было построено дерево ML (максимальной правдоподобия) с теми же параметрами бутстрепа, байесовской дерево BI (цепочки длиной 400000 генераций с отбрасыванием первых 10%) в программе MrBayes [43] в плагине, встроенном в Geneious® 6.0.5. MSN (Minimum Spanning Network) алгоритм был использован для построения сети гаплотипов в программе PopArt [44]. Для построения деревьев и матрицы дистанций были использованы последовательности, депонированные в базе нуклеотидных последовательностей GenBank® (NCBI), содержащие исследованные участки мтДНК: NC_002081 (*Gadus morhua*), NC_004379 (*Lota lota*), NC_004449 (*Gadus chalcogrammus*), NC_007396 (*Melanogrammus aeglefinus*), NC_010121 (*Boreogadus saida*), NC_010122 (*Arctogadus glacialis*), NC_015094 (*Pollachius virens*), NC_036931 (*Gadus macrocephalus*), MT410897 (*Merluccius merluccius*), LC487915 (*Coryphaenoides cinereus*). Обозначение выборок для филогенетического анализа: ТО (EgrOS1) выборка из Охотского моря, WS (EnWS1) выборка из Белого моря, KarS (EnKS) выборка из Карского моря, BarS (EnBS) выборка из Баренцева моря.

Полученные в работе последовательности фрагмента гена *COI* депонированы в GenBank с номерами последовательностей для гаплотипов Har_1–Har_10: OQ826811–OQ826820.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из проведенных локус-специфичных тестов на соответствие наблюдаемых генотипических распределений теоретическому распределению Харди–Вайнберга были получены достоверные отличия между H_E и H_O (табл. 1), после коррекции Бонферрони для множественных тестов отклонения от равновесия Харди–Вайнберга наблюдались в трех тестах по локусу *Gmo34* в выборках наваги и атлантической трески (табл. 1), наиболее вероят-

ной причиной таких отклонений может быть мутация в праймерной области.

Из исследованных у наваги (северная навага и тихоокеанская навага) шести микросателлитных локусов все были полиморфными. Пять из них были низкополиморфными (*PGmo32*, *Gmo8*, *GmoG18*, *Gmo35*, *Gmo3*) с 2–3 аллелями. Только локус *Gmo34* демонстрировал более высокий полиморфизм: 7 и 10 аллелей у *E. nawaga* и *E. gracilis* соответственно (табл. 2). Виды рода *Eleginus* демонстрировали сходные не только уровень полиморфизма, но также и диапазон длин аллелей микросателлитных локусов (за исключением некоторых отличий в локусе *Gmo8*, где отмечается расширенный диапазон длин аллелей у *E. gracilis*). При этом, атлантическая и тихоокеанская треска демонстрировали значительные отличия по данным показателям (табл. 2).

Оценка генетических идентичности и дифференциации была выполнена по исследованным микросателлитным локусам на основе значений I , θ , F_{ST} . Результаты показывают низкие значения генетической идентичности представителей рода *Eleginus* по отношению к атлантической треске и тихоокеанской треске. Соответственно показан высокий уровень генетической дифференциации между навагой и треской (табл. 3). По расположению точек, соответствующих особям из выборок разных видов семейства Gadiade на диаграмме PoSA (рис. 1,а) прослеживается обособленность выборок рода *Gadus*. Оценка θ продемонстрировала высокое достоверное значение генетической дифференциации между выборками северной наваги и тихоокеанской наваги, что вполне соответствовало их ранее установленному видовому статусу [1] (табл. 4), также самостоятельные кластеры образуют *E. nawaga* и *E. gracilis* на диаграмме PCoA (рис. 1,б). Наличие выборок северной наваги из трех морей: Белого, Баренцева и Карского, давало повод для проведения сравнений между отдельными локальностями. Результаты показывают низкие значения генетической дифференциации F_{ST} между выборками из Баренцева и Карского морей (0.011, $P > 0.05$) При этом попарные дистанции F_{ST} имеют высокие значения (0.129–0.146, $P \geq 0.001$) между беломорскими выборками наваги, выделяющимися в отдельный кластер, и навагой из Баренцева и Карского морей (рис. 2).

После множественного выравнивания последовательностей был исследован участок гена *COI* длиной 589 пн, было выявлено 15 вариабельных сайтов, из них 13 информативных, 14 транзиций и 2 трансверсии, все замены – синонимичные. Среди 33 исследованных последовательностей было выделено десять гаплотипов, образовавших две группы, различающихся на 8–13 замен (~1.3–2.2% различий). К первой группе принадлежали четыре гаплотипа, обнаруженных в выборке из Охот-

Таблица 2. Сравнительные характеристики микросателлитных локусов представителей тресковых

Локус и вид	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>Ar</i>	Размер аллелей, пн
<i>PGmo32</i>				
<i>E. nawaga</i>	135	2	1.647	106–112
<i>E. gracilis</i>	115	2	1.321	106–112
<i>G. morhua</i>	57	4	3.437	103–115
<i>G. macrocephalus</i>	46	4	3.786	111–129
<i>Gmo8</i>				
<i>E. nawaga</i>	133	2	1.104	162–166
<i>E. gracilis</i>	115	3	2.120	162–222
<i>G. morhua</i>	57	23	18.634	118–294
<i>G. macrocephalus</i>	46	31	27.962	170–386
<i>Gmo-G18</i>				
<i>E. nawaga</i>	135	3	2.430	121–133
<i>E. gracilis</i>	115	2	1.463	125–137
<i>G. morhua</i>	58	3	2.490	113–129
<i>G. macrocephalus</i>	46	2	1.916	117–129
<i>Gmo34</i>				
<i>E. nawaga</i>	133	7	5.939	72–100
<i>E. gracilis</i>	114	8	5.933	72–100
<i>G. morhua</i>	58	4	3.590	96–116
<i>G. macrocephalus</i>	49	17	15.506	116–184
<i>Gmo35</i>				
<i>E. nawaga</i>	131	2	2.000	107–110
<i>E. gracilis</i>	115	2	1.389	107–113
<i>G. morhua</i>	56	8	7.319	125–149
<i>G. macrocephalus</i>	49	3	2.332	116–125
<i>Gmo3</i>				
<i>E. nawaga</i>	135	3	2.257	92–104
<i>E. gracilis</i>	115	3	1.983	92–100
<i>G. morhua</i>	58	4	3.590	160–192
<i>G. macrocephalus</i>	49	2	1.400	192–196

Примечание. *N* – объем выборки, *A* – число аллелей на локус, *Ar* – аллельное разнообразие, скорректированное на минимальный размер выборки.

ского моря (ТО), другие шесть гаплотипов второй группы выявлены в выборках из Белого, Баренцева и Карского морей. Генетическое разнообразие в выборке ТО (*E. gracilis*) выше, чем в выборках *E. nawaga*. Среди выборок *E. nawaga* значения генетического разнообразия выше в выборке VarS (табл. 5).

В выборках *E. nawaga* доминируют два гаплотипа, обнаруживаемые во всех выборках, в каждой выборке присутствует собственный гаплотип (рис. 3). Гаплотипы ТО (*E. gracilis*) образуют сестринскую кладу, с максимальными значениями поддержки (100/100/1.0) независимо от способа построения деревьев по отношению к гаплотипам *E. nawaga*. Средние дистанции между *E. nawaga* и *E. gracilis* составляют 0.018 (табл. 6), по отношению к другим видам дистанции меняются от 0.123 с *Arctogadus glacialis* до 0.222 с *Coryphaenoides cinerus*.

При построении деревьев полученные гаплотипы образуют собственную кладу рода *Eleginus* сестринскую по отношению к другим представителям сем. Gadidae (рис. 4), независимо от способа построения дерева. В случае VI-дерева клада рода *Eleginus* кластеризуется с *L. lota*, при этом дистанции K2P составляют 0.16 между *L. lota* и *E. gracilis*, 0.15 между *L. lota* и *E. nawaga*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученное по микросателлитам высокое значение генетической дифференциации ($\theta = 0.548$) между выборками северной наваги и тихоокеанской наваги на уровне межвидового поддерживает представления об их дивергенции в четвертичном периоде на фоне прогрессировавшего выхолаживания Арктики [24, 45].

На основе баркодингового участка гена *COI*, гаплотипы *E. nawaga* формируют самостоятельную сестринскую кладу по отношению к *E. gracilis*. При этом средние дистанции между ними составляют небольшие значения (0.018), что видимо указывает на “относительно недавнее” расхождение этих видов: в пределах 1–2 млн лет назад в зависимости от оценки скорости мутаций мтДНК [46, 47]. Близкие оценки времени расхождения этих видов (2.32 млн лет назад) были получены на основе анализа последовательностей митохондриального гена *Cytb*, при этом дистанции между видами были несколько выше (2.53%), чем полученные нами [45]. Дистанции между *E. nawaga* и *E. gracilis* ниже, чем в среднем у морских рыб между представителями одного рода и близки к внутривидовым, при этом дистанции по отношению к другим представителям семейства Gadidae выше, чем средние дистанции для морских рыб между родами внутри семейства [46]. Полученные данные поддерживают видовой статус *E. nawaga* и *E. gracilis* [1].

Таблица 3. Оценки по шести микросателлитным локусам генетической идентичности (I) (над диагональю) и генетической дифференциации (θ) (под диагональю) между навагой (EnWS1, EnWS2, EnBS, EnKS, EgrOS2, EgrOS3), атлантической треской (GmoBS1, GmoBS2) и тихоокеанской треской (GmacOS1, GmacOS2)

Выборки	Навага	Атлантическая треска	Тихоокеанская треска
	1	2	3
1	xxx	0.004–0.197	0.001–0.232
2	0.462 (0.272–0.658)	xxx	0.139–0.212
3	0.489 (0.267–0.705)	0.487 (0.258–0.682)	xxx

Примечание: В скобках – 95% доверительный интервал.

На основе анализа микросателлитных локусов показан достаточно высокий уровень генной дифференциации северной наваги, населяющей внутренний водоем – Белое море, по отношению к демонстрирующей высокий уровень идентич-

ности северной наваге Карского и Баренцева морей. Можно предположить, что такая дифференциация является результатом послеледникового расселения в “оттаявшее” Белое море северной наваги, возможно переживавшей вюрмский стадиал в прибрежных акваториях с выносами пресных вод в юго-восточной части Баренцева моря и юго-западной части Карского моря. Существующее в литературе предположение [48] о послеледниковом заселении северной навагой акваторий Карского, Баренцева, Белого морей из так называемого ее “ледникового рефугиума” в акваториях Восточно-Сибирского моря и моря Лаптевых, в том числе, весьма маловероятно по причине того, что даже в настоящее время (межледниковье с более высокими температурами) представители рода *Eleginus* отсутствуют в этих районах (кроме Хатангского залива в западной части моря Лаптевых) на фоне, в том числе, низких температур воды.

В соответствии с полученными данными по изменчивости микросателлитных локусов, представители рода *Eleginus* демонстрировали высокий уровень генетической дифференциации (группировки с отчетливой генетической подразделенностью (по классификации Л.А. Животовского [49]))

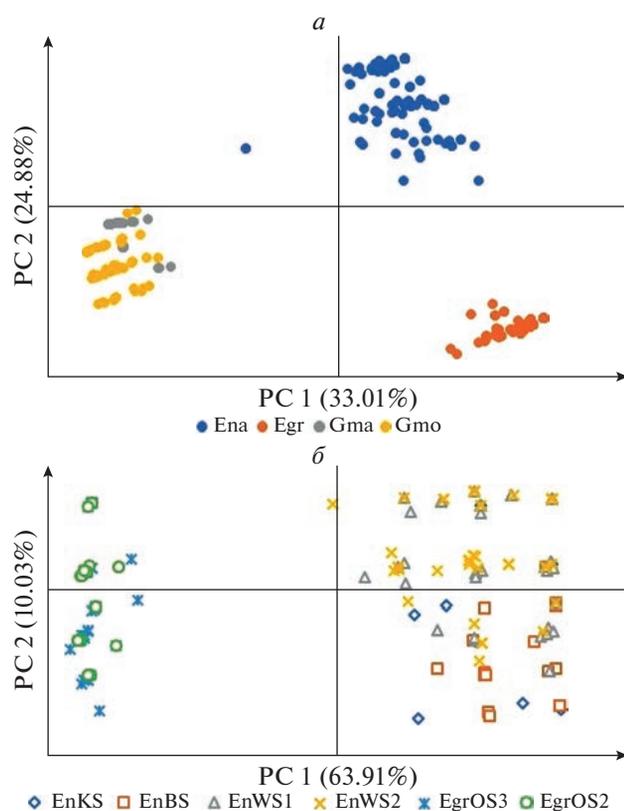


Рис. 1. Расположение представителей Gadidae в пространстве двух главных координат на основе шести микросателлитных локусов. а – для всех исследованных видов, обозначения на рисунке – Ena (EnKS, EnBS, EnWS1, EnWS2), Egr (EgrOS3, EgrOS2), Gma (GmacOS1, GmacOS2), Gmo (GmoBS2, GmoBS1); б – для представителей рода *Eleginus*. Обозначения выборок как в табл. 2.

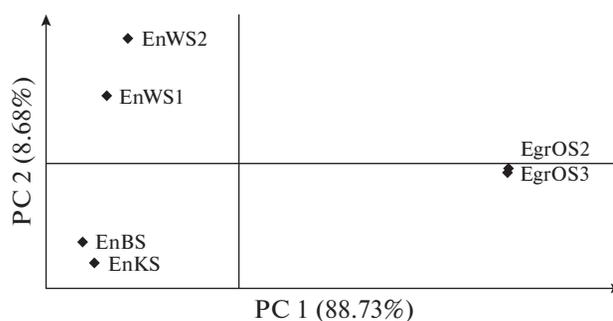


Рис. 2. Диаграмма PCoA выборок рода *Eleginus* на основе матрицы попарных дистанций (F_{ST}) по микросателлитным локусам. Обозначения выборок как в табл. 2.

Таблица 4. Уровень генетической дифференциации (θ) северной наваги (*E. nawaga*), тихоокеанской наваги (*E. gracilis*) (по 6 микросателлитным локусам)

Сравниваемые таксоны	θ
Между северной навагой (EnWS1, EnWS2, EnBS, EnKS) и тихоокеанской навагой (EgrOS2, EgrOS3)	0.639 (0.213; 0.880)
У северной наваги между Карским (EnKS) и Баренцевым (EnBS) морями	-0.002 (-0.013; 0.012)
У северной наваги между Белым морем (EnWS1, EnWS2) и совместно Карским и Баренцевым морями (EnBS, EnKS)	0.190 (-0.009; 0.319)

Примечание см. к табл. 3.

Таблица 5. Характеристики генетического разнообразия в выборках рода *Eleginus* на основе гаплотипов *COI* мтДНК

Вид	Выборка	<i>N</i>	<i>h</i>	<i>h_u</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	<i>Pi</i>	<i>Hd (SD)</i>
<i>E. gracilis</i>	ТО	5	4	—	4	1.600	0.00272	0.900 (0.161)
<i>E. nawaga</i>	WS	10	4	1	4	1.067	0.00181	0.711 (0.117)
	KarS	9	4	1	4	1.500	0.00255	0.750 (0.112)
	VarS	9	4	1	3	1.444	0.00143	0.806 (0.089)
	Для всех	28	6	—	5	1.304	0.00221	0.725 (0.054)

Примечание. *N* – количество исследованных образцов, *h* – количество гаплотипов, *h_u* – уникальные гаплотипы, *S* – число сегрегирующих сайтов, *k* – среднее число нуклеотидных различий, *Pi* – нуклеотидное разнообразие, *Hd (SD)* – гаплотипическое разнообразие и стандартное отклонение.

по отношению к роду *Gadus* атлантической треске (*G. morhua*) и тихоокеанской треске (*G. macrocephalus*), что, соответственно, поддерживает их принадлежность к различным родам. Филогенетический анализ также подтверждает самостоятельность рода *Eleginus*, который формирует самостоятельную кладу с высокой степенью поддержки и большими дистанциями между ближайшими видами подсемейства Gadinae (0.123–0.144).

Согласно систематике отряда Gadiformes А.Н. Световидова [1], род *Eleginus* входит в состав подсемейства Gadinae, при этом на основе полученных данных род *Eleginus* может рассматриваться даже в рамках отдельного подсемейства. Результаты данного исследования являются предварительными и для более точного положения рода *Eleginus* на дереве отряда Gadiformes необходимо изучение более длинных последова-

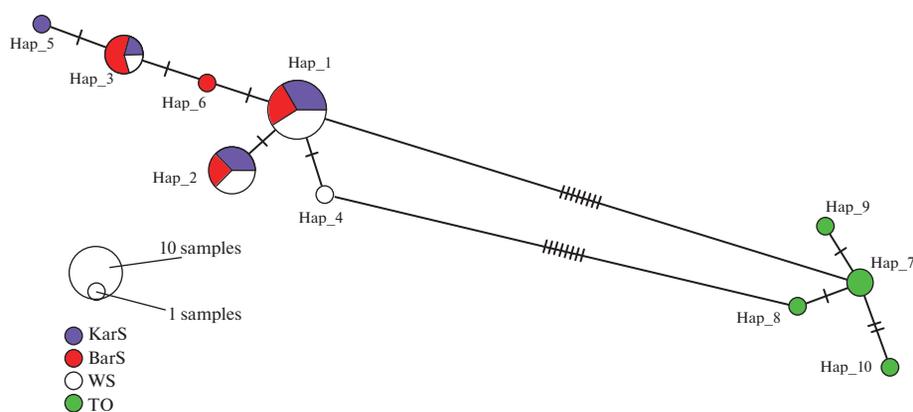


Рис. 3. MSN сеть гаплотипов *COI* мтДНК рода *Eleginus*. Цветом обозначается регион происхождения: зеленый – ТО (Охотское море), белый – WS (Белое море), красный – VarS (Баренцево море), фиолетовый – KarS (Карское море), насечки – количество замен между гаплотипами, диаметры кругов пропорциональны количеству особей.

Таблица 6. Средние дистанции (K2P) между видами отряда Gadiformes на основе фрагмента *COI* (под диагональю) и значения стандартного отклонения (над диагональю)

<i>E. nawaga</i>		0.005	0.017	0.017	0.016	0.016	0.017	0.017	0.018	0.020	0.018	0.022
<i>E. gracilis</i>	0.018		0.017	0.017	0.016	0.016	0.017	0.017	0.019	0.020	0.017	0.023
<i>G. morhua</i>	0.135	0.133		0.007	0.008	0.008	0.008	0.014	0.012	0.022	0.019	0.021
<i>G. chalcogrammus</i>	0.140	0.132	0.030		0.008	0.009	0.009	0.013	0.012	0.023	0.019	0.021
<i>G. macrocephalus</i>	0.129	0.126	0.035	0.040		0.010	0.009	0.014	0.013	0.022	0.019	0.021
<i>A. glacialis</i>	0.123	0.124	0.038	0.046	0.050		0.008	0.015	0.013	0.021	0.020	0.020
<i>B. saida</i>	0.130	0.131	0.042	0.048	0.053	0.040		0.015	0.014	0.021	0.020	0.021
<i>P. virens</i>	0.144	0.137	0.097	0.091	0.093	0.103	0.104		0.013	0.021	0.020	0.021
<i>M. aeglefinus</i>	0.162	0.168	0.089	0.087	0.102	0.095	0.099	0.095		0.021	0.018	0.022
<i>M. merluccius</i>	0.192	0.190	0.213	0.206	0.202	0.201	0.202	0.210	0.204		0.019	0.023
<i>L. lota</i>	0.159	0.150	0.177	0.166	0.170	0.177	0.186	0.183	0.174	0.169		0.023
<i>C. cinereus</i>	0.222	0.216	0.207	0.211	0.214	0.197	0.211	0.213	0.226	0.235	0.227	

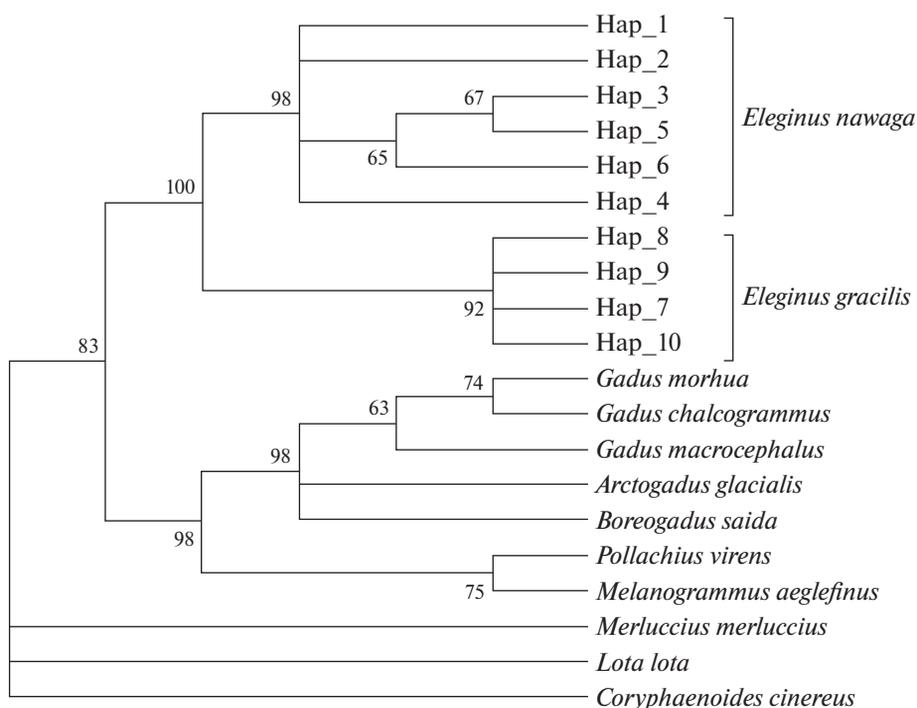
тельностью мтДНК. Также для лучшего понимания процессов формирования видов важно как увеличение объема исследуемого материала, так и вовлечение в анализ более быстро эволюционирующих участков мтДНК, например контрольного региона мтДНК.

Авторы выражают свою признательность и благодарность сотрудникам А.Г. Бушу, сотрудни-

кам МагаданНИРО за помощь в формировании выборок наваги.

Работа выполнена в рамках Госзаданий ФГБНУ “ВНИРО” и МГУ.

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

**Рис. 4.** Конденсированное ML дерево (порог 60%), построенное на основе гаплотипов *COI* отряда Gadiformes, в узлах дерева значения бутстрепа, гаплотипы, полученные в работе обозначены, как Нав.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Световидов А.Н. Трескообразные. Фауна СССР. Рыбы. Т. 9. Вып. 4. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1948. 221 с.
2. Ульченко В.А., Матковский А.К., Степанов С.И. и др. Рыбные ресурсы и их освоение в эстуариях морей Карского и Лаптевых // Труды ВНИРО. 2016. Т. 160. С. 116–132.
3. Helser T.E., Colman J.R., Anderl D.M., Kastelle C.R. Growth dynamics of saffron cod (*Eleginus gracilis*) and Arctic cod (*Boreogadus saida*) in the Northern Bering and Chukchi Seas // Deep Sea Research. Part II. Topical Studies in Oceanography. 2017. V. 135. P. 66–77.
4. Андрияшев А.П., Чернова Н.В. Аннотированный список рыбообразных и рыб морей Арктики и сопредельных вод // Вопр. ихтиол. 1994. Т. 34. № 4. С. 435–456.
5. Стасенков В.А. Биология и промысел наваги *Eleginus nawaga* (Pallas) Белого моря. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ВНИРО, 1991. 24 с.
6. Стасенков В.А. Многолетняя динамика биологических показателей наваги *Eleginus nawaga* (Walbaum, 1792) Белого моря в связи с изменениями температурного режима водоема // Вестник МГТУ. 2017. Т. 20. № 2. С. 370–380. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2017-20-2-370-380>
7. Сафронов Е.Н., Варюхин А.В. Температурный режим воды в прудовом рыбоводстве // Зооиндустрия. 2003. № 11. С. 12–15.
8. Стасенков В.А., Гончаров Ю.В. Размерно-возрастная структура наваги *Eleginus nawaga* Белого, Баренцева и Карского морей // Вопр. ихтиол. 2020. Т. 60. № 3. С. 297–308. <https://doi.org/10.31857/S0042875220030224>
9. Николотова Л.А. О питании дальневосточной наваги (*Eleginus navaga gracilis*) // Известия ТИНРО. 1954. 286–288.
10. Кукушкина Н.А., Щербина А.И. Сравнительная эколого-морфологическая характеристика ледовитоморской наваги *Eleginus navaga* (Pal.) Белого и Чешской губы Баренцова моря // Вопр. ихтиол. 1977. Т. 17. Вып. 6 (107). С. 1123–1127.
11. Новикова О.В. Промысел, распределение и некоторые особенности биологии наваги (*Eleginus gracilis* (Tilesius)) прикамчатских вод // Исслед. водн. биол. ресурсов Камчатки и сев.-зап. части Тихого океана // Сб. науч. тр. КамчатНИРО. 2002. Вып. 6. С. 120–130.
12. Ракитина М.В., Смирнов А.А. Тихоокеанская навага (*Eleginus gracilis* Tilesius) Тауйской губы Охотского моря: экология, современное состояние запаса и перспективы промысла // Рыбное хозяйство. 2018. № 3. С. 49–52.
13. Махотин В.В. Ранний онтогенез тресковых рыб Белого моря. Специфика морфогенетических процессов в раннем онтогенезе костистых рыб (на примере развития тресковых). М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2021. 197 с.
14. Maznikova O.A., Orlov A.M. Navaga *Eleginus nawaga* of the White Sea: A brief review with emphasis on the Soviet-Russian literature // Polar Biol. 2020. V. 43. P. 1159–1173. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02681-8>
15. Sme N., Lyon S., Canino M. et al. Distinction of saffron cod (*Eleginus gracilis*) from several other gadid species by using microsatellite markers // Fishery Bulletin. 2017. V. 116. № 1. P. 60–68. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1723734/v1>
16. Zardoya R., Vollmer D.M., Craddock C. et al. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes) // Proc. of the Royal Soc. B. Biol. Sciences. 1996. V. 263. № 1376. P. 1589–1598.
17. Abdul-Muneer P.M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation strategies // Genet. Res. International. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>
18. Строганов А.Н. Формирование генетического разнообразия в популяциях тихоокеанской трески (*Gadus macrocephalus* Tilesius) (Gadidae) // Генетика. 2013. Т. 49. № 11. С. 1300–1305. <https://doi.org/10.7868/S0016675813090105>
19. Строганов А.Н., Семенова А.В., Черенкова Н.Н. К таксономии рода *Gadus* (Gadidae): формирование современной структуры // Генетика. 2017. Т. 53. № 12. С. 1427–1435. <https://doi.org/10.1134/S1022795417120122>
20. Строганов А.Н., Орлов А.М., Афанасьев К.И. и др. Предварительные данные по изменчивости трех микросателлитных локусов у тихоокеанской *Gadus macrocephalus* и атлантической *G. morhua* трески (Gadidae) // Вопр. ихтиол. 2009. Т. 49. № 2. С. 191–199. <https://doi.org/10.1134/S0032945209020039>
21. Skarstein T.H., Westgaard J.-I., Fevolden S.-E. Comparing microsatellite variation in North East Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to genetic structuring as revealed by pantophysin (Pan I) locus // J. Fish. Biol. 2007. V. 70. P. 271–290. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01456.x>
22. Wennevik V., Jorstad K.E., Dahle G., Fevolden S.E. Mixed stock analysis and the power of different classes of molecular markers in discriminating coastal and oceanic Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on the Lofoten spawning grounds, Northern Norway // Hydrobiologia. 2008. V. 606. P. 7–25. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9349-5>

23. Строганов А.Н., Афанасьев К.И., Иорстад К.Е. и др. Данные по изменчивости микросателлитных локусов у гренландской трески *Gadus ogac* Richardson 1836: сравнение с представителями рода *Gadus* (Gadidae) // Вопр. ихтиол. 2011. Т. 51. № 6. С. 770–777.
<https://doi.org/10.1134/S0032945211060087>
24. Stroganov A.N. Genus *Gadus* (Gadidae): Composition, distribution, and evolution of forms // J. of Ichthyology. 2015. V. 55. № 3. P. 319–336.
<https://doi.org/10.1134/S0032945215030145>
25. Angers B., Bernatchez L. Usefulness of heterologous microsatellites obtained from brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchell, in other *Salvelinus* species // Mol. Ecol. 1996. V. 5. № 2. P. 317–319.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00922.x>
26. Patton J.C., Gallaway B.J., Feckhelm R.G., Cronin M.A. Genetic variation of microsatellite and mitochondrial DNA markers in broad whitefish (*Coregonus nasus*) in the Colville and Sagavanirktok rivers in northern Alaska // Canadian J. of Fisheries and Aquatic Sci. 1997. V. 54. № 7. P. 1548–1556.
27. Perry G.M.L., King T.L., T.-Cyr J.S. et al. Isolation and cross-familial amplification of 41 microsatellites for the brook charr (*Salvelinus fontinalis*): PRIMER NOTE // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5. № 2. P. 346–351.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00922.x>
28. Bezault E., Rognon X., Gharbi K. Microsatellites cross-species amplification across some african cichlids // Int. J. Evol. Biol. 2012. V. 2012. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2012/870935>
29. Строганов А.Н., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А. и др. Данные по изменчивости микросателлитных локусов у кильдинской трески *Gadus morhua kildinensis* (Gadidae) // Вопр. ихтиол. 2011. Т. 51. № 4. С. 459–466.
30. Weir B.S. Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data. Massachusetts: Sinauer Ass. Sunderland, 1996. 445 p.
31. Lewis P.O., Zaykin D. Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data. 2001. Version 1.0 (d16c). <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
32. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89. P. 583–590.
33. Ивантер Э.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск: Петрозаводск. гос. ун-т, 2003. 304 с.
34. FSTAT 2.9.3. <http://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>
35. Peakall R., Smouse P.E. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
36. Ponomareva E.V., Volkov A.A., Ponomareva M.V. et al. European grayling phylogeographic lineages of Russian European North from barcoding DNA fragment // Bulgarian J. of Agricultural Sci. 2022. V. 28. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/conf.fmars.2019.07.00068>
37. Villesen P. FaBox: An online toolbox for fasta sequences // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. № 6. P. 965–968.
38. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
39. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. of Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111–120.
40. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The barcode of life data system // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. P. 355–364. <http://www.barcodinglife.org>.
41. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. and Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
42. Lefort V., Longueville J.-E., Gascuel O. SMS: Smart model selection in PhyML // Mol. Biol. and Evol. 2017. V. 34. I. 9. P. 2422–2424.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
43. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics Applications Note. 2001. V. 17. № 8. P. 754–755.
44. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. and Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
45. Laakkonen H.M., Hardman M., Strelkov P., Väinölä R. Cycles of trans-Arctic dispersal and vicariance, and diversification of the amphiboreal marine fauna // J. Evol. Biol. 2021. V. 34. P. 73–96.
<https://doi.org/10.1111/jeb.13674>
46. Avise J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. N.Y.: Chapman and Hall, 1994. 511 p.
47. Stepien C.A., Dillon A.K., Patterson A.K. Population genetics, phylogeography, and systematics of the thornyhead rockfishes (*Sebastolobus*) along the deep continental slopes of the North Pacific Ocean // Canadian J. of Fisheries and Aquatic Sciences. 2000. V. 57. № 8. P. 1701–1717.
<https://doi.org/10.1139/f00-095>
48. Gharrett A.J., Chernova N.V., Sme N.A. et al. Demography of a nearshore gadid (*Eleginus nawaga*) from the Barents Sea coast during the last glacial period // Res. Square. 2022. P. 1–19.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1723734/v1>
49. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 276 с.

Phylogeny of the Genus *Eleginus* (Gadidae) according to the Analysis of the Variability of Microsatellite Locus and mtDNA *COI* Fragment

A. N. Stroganov^{a, *}, E. V. Ponomareva^a, M. V. Ponomareva^a, E. A. Shubina^a, K. A. Zhukova^a,
A. A. Smirnov^{b, c}, T. A. Rakitskaya^d, and M. V. Rakitina^e

^aMoscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bAll-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, 107140 Russia

^cNorth-Eastern State University (NEGU), Magadan, 685000 Russia

^dVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^eMagadan Branch of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (MagadanNIRO),
Magadan, 685000 Russia

*e-mail: andrei_str@mail.ru

Genetic methods based on the study of the variability of mitochondrial (*COI*) and nuclear (microsatellites) DNA were used to study the processes of morphogenesis in the genus *Eleginus*. The revealed level of genetic differentiation characterizes the Pacific Saffron cod (*Eleginus gracilis*) and Navaga (*Eleginus nawaga*) as independent species that diverged in a relatively recent period at the boundary of the Pliocene and Pleistocene. The White Sea Navaga's populations were by microsatellites markers differed from the Navaga inhabiting the basins of the Kara and the Barents seas. At the same time, it is assumed that the Kara-Barents Sea region could act as a "glacial refugium", which ensured the post-glacial settlement of Navaga, including in the "watered" White Sea depression. Phylogenetic analysis based on *COI* haplotypes diversity reveals demand of possible reorganization in order Gadiformes, including *Eleginus* in an independent subfamily – sister in relation to the subfamilies Gadinae, Lotinae, Merlucciinae. The prospects of improving genetic methodological approaches in the framework of the development of research on Saffron cod are noted.

Keywords: Navaga, Saffron cod, microsatellite loci, *COI*, taxonomic status.

ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ КОПЕПОД *Salmincola* (Copepoda, Siphonostomatoida, Lernaeopodidae): ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СКОРОСТЬ ЭВОЛЮЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМ c-ОКСИДАЗЫ I

© 2023 г. С. В. Шедько¹ *, М. Б. Шедько¹, И. Л. Мирошниченко¹, Г. А. Немкова¹

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: shedko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 02.05.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Штрихкодированный фрагмент гена *COI* секвенирован у 91 образца пяти видов паразитических копепод *Salmincola*, снятых с лососевых рыб в основном с Дальнего Востока России (ДВР): *S. californiensis* (микижа и сима) и *S. edwardsii* (различные виды гольцов, нерка из оз. Кроноцкое), *S. carpionis* (различные виды гольцов), *S. markewitschi* (кунджа), *S. stellata* (сахалинский таймень). Всего был найден 41 вариант гаплотипов с максимальным уровнем различий 0.183 нуклеотидных замен на позицию. Расстояние между видами варьировало от 0.139 ± 0.014 (в паре *S. markewitschi*–*S. carpionis*) до 0.179 ± 0.015 (в паре *S. stellata*–*S. californiensis*). Внутривидовое нуклеотидное разнообразие фрагмента гена *COI* намного ниже и составило для *S. californiensis* и *S. edwardsii*, населяющих жаберную полость и плавники хозяина – 0.013 ± 0.003 и 0.015 ± 0.003 , а для *S. stellata*, *S. markewitschi* и *S. carpionis*, локализуемых в ротоглоточной полости хозяев – 0.002 ± 0.001 , 0.004 ± 0.001 и 0.005 ± 0.001 соответственно. Сравнение выборок трех видов копепод *Salmincola* из разных районов ДВР выявило существенную ($F_{st} = 0.28–0.42$, $P \ll 0.001$) генетическую подразделенность. Три субклады *edwardsii*-подобных копепод – *S. edwardsii* с ДВР, *S. edwardsii* с американской ручьевой палии востока Северной Америки и *S. siscowet* с озерной палии штата Мичиган (*COI*-последовательности копепод из последних двух групп взяты из генетических баз данных) – различались между собой в среднем по 9.3–10.9% нуклеотидных позиций, что указывает на необходимость таксономической ревизии *S. edwardsii*. Согласно проведенному молекулярному датированию дивергенция линий *Salmincola* началась в миоцене и завершилась в раннем плиоцене. Филогенетическая скорость составила 0.023 (95%-ный интервал: 0.013–0.033) нуклеотидных замен на позицию на млн лет на линию. Скорость нуклеотидных замещений на популяционном уровне оказалась в 3.7 раза выше – 0.085 (0.021–0.170). Высокий уровень изменчивости фрагмента гена *COI* делает этот маркер удобным инструментом как для разработки систематики и филогении копепод *Salmincola* и Lernaeopodidae на видовом и родовом уровнях, так и для анализа дифференциации их популяций.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, систематика, молекулярные часы.

DOI: 10.31857/S0016675823100119, **EDN:** UAJHRE

В настоящее время сравнительный анализ ДНК составляет одну из основ современной систематики. В прошлом молекулярно-генетические данные большей частью привлекались лишь для проверки обоснованности описания новых видов и/или сведения их в синонимы, проведенных систематиками-морфологами. Однако в последние десятилетия из-за неуклонного снижения числа квалифицированных специалистов-морфологов все более и более актуальным становится создание условий для корректной идентификации организмов широким кругом исследователей не только по морфологическим, но и по другим при-

знакам. Сравнительно дешевые и не очень сложные в использовании (часто шаблонные) методы молекулярной систематики могут помочь в решении обозначившейся проблемы.

Копеподы являются типичными обитателями морских и пресных вод и распространены повсеместно. Две трети из 14 500 известных видов копепод – свободноживущие, ведут планктонный или бентический образ жизни, либо симбиотические организмы. Остальные известны как паразиты [1]. Семейство Lernaeopodidae с 48 родами и более чем 300 видами относится к их числу [2]. Копеподы этого семейства являются исключительно па-

разитическими формами, прикрепляющимися к хозяину с помощью уникального якоробразного органа — буллы, вырабатываемой из секрета фронтальной железы [3]. Их фиксация на теле хозяина необратима и привязана к определенному месту (топическая специфичность). Большинство из Lernaeorodidae являются паразитами морских рыб. Пресноводная группа Lernaeorodidae включает в себя семь родов, из которых наиболее известны обитающие на лососевых рыбах (хариусах, сигах и собственно лососях) три рода: *Salmincola* Wilson, 1915 (23 вида), *Coregonicola* Markewitsch, 1936 (3 вида) и *Basanistes* Nordmann, 1832 (4 вида) [2, 4, 5]. Копеподы *Salmincola* являются объектами повышенного интереса в силу их паразитирования на промысловых видах лососевых в природе и в условиях аквакультуры, а также на видах, являющихся объектами спортивного рыболовства, на которых могут оказывать патогенное влияние различной степени и характера [6–12]. Кроме того, интерес вызывает их высокая, как правило, степень специфичности к хозяевам [3–5], что открывает широкие возможности для исследования особенностей и закономерностей сопряженной эволюции хозяев и их паразитов.

Определение видов Lernaeorodidae требует небольшого опыта и навыков в препарировании образцов, изготовлении препаратов для микроскопии и их анализе. Необходимым представляется наличие в распоряжении исследователя показательной коллекции препаратов разных видов для сравнения. Именно для подобных случаев разработка систем ДНК-идентификации представляется актуальной задачей. В последние годы такие системы чаще всего выстраиваются на базе анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей так называемого штрихкодowego фрагмента гена субъединицы I цитохром с-оксидазы (cytochrome c oxidase subunit I, *COI*) [13].

Цель настоящей работы — создание основ ДНК-идентификации паразитических копепод рода *Salmincola* путем анализа изменчивости фрагмента гена *COI* у пяти видов этого рода, обитающих на лососевых рыбах Дальнего Востока России, морфологически и экологически достаточно подробно здесь изученных [14–26]: *S. californiensis* (Dana, 1852) — паразита микижи *Parasalmon mykiss* (Walbaum, 1792) и пяти видов тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*, локализация на хозяине — жаберная полость, жаберные лепестки, плавники, а также [*O. kisutch* (Walbaum, 1792), *O. nerka* (Walbaum, 1792)] — ротовая полость; *S. edwardsii* (Olsson, 1869) — типичного паразита различных видов гольцов рода *Salvelinus* и, как исключение, жилой формы *O. nerka* оз. Кроноцкое, локализация на хозяине — жаберная полость, реже жаберные лепестки, единично — плавники; *S. carpinis* (Krøyer, 1837) — обычного паразита многих видов *Salvelinus*, за исключением кунджи *Salvelinus leucomaenis* (Pal-

las, 1814), локализация — ротоглоточная полость; *S. markewitschi* Shedko et Shedko, 2002 — специфичного для кунджи паразита, локализация — ротоглоточная полость; *S. stellata* Markevich, 1936 — специфичного для сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) паразита, локализация — ротоглоточная полость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего для генетического исследования нами был использован материал от пяти видов *Salmincola* (91 копепода), зафиксированный в 70%-ном спирте, собранный с десяти видов лососевых рыб, отловленных в 15 локалитетах (табл. 1, рис. 1). Все образцы до выделения из них ДНК были идентифицированы до вида по стандартному набору морфологических диагностических признаков [3–5, 15–17]. Суммарную ДНК получали из яйцевых мешков или кусочков туловища копепод солевым способом [27] при использовании протеиназы К.

Аmplификацию фрагмента гена субъединицы I цитохром с-оксидазы осуществляли с помощью пары универсальных праймеров LCO1490 и HC02198 [28], согласно условиям, указанным их разработчиками, в термоблокере Biometra TProfessional (“Biometra”, Германия) в 25 мкл реакционной смеси, включавшей 0.1–0.2 мкг суммарной ДНК, 2.5 мкл буфера (60 мМ трис-НСl, рН 8.5; 1.5 мМ MgCl₂; 25 мМ KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0.1%-ный тритон X-100), 0.5 мкл суммы дезокситрифосфатов из 10 мМ раствора, по 2.5 мкл обоих праймеров (“Синтол”, Москва) из их 2 мкМ растворов, 1 единицу активности Taq-полимеразы (“СибЭнзим”, Новосибирск) и деионизированную воду.

Продукты амплификации очищали этаноловым переосаждением и секвенировали с помощью набора Big Dye Terminator версии 3.1 (“Applied Biosystems”, США) при использовании праймеров LCO1490 и HC02198. Продукты реакции секвенирования разделяли на автоматическом анализаторе ABI Prizm 3130 (“Applied Biosystems”, США/“Hitachi”, Япония) или Нанофор-05 (“Синтол”, Москва) из приборной базы ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток). ABI-хроматограммы собирали в контиги с помощью программ из пакета Staden [29]. Необходимые манипуляции с нуклеотидными последовательностями проводили с помощью пакета программ Seaview [30].

Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента гена *COI* длиной 654 пн были депонированы в GenBank под номерами доступа OQ843970–OQ844060.

В дополнение к собственному материалу в работе были использованы 35 последовательностей фрагмента *COI* от копепод *Salmincola*, взятых из

Таблица 1. Число исследованных образцов пяти видов паразитических копепоид рода *Salmincola*, их хозяева, происхождение выборок

SST (n = 10)	Вид копепоиды*					Хозяин**	Код выборки	Место сбора материала	Дата сбора материала	Сборщик
	SMR (n = 26)	SCR (n = 26)	SCL (n = 20)	SED (n = 9)						
8	2	1	6	1		PE LE CU MS MS LE LE	р. Амгу, Приморье р. Амгу, Приморье р. Максимовка, Приморье р. Максимовка, Приморье р. Кузнецова, Приморье р. Кузнецова, Приморье р. Белая, о. Сахалин	05.11.2011 05.11.2011 26.07.2008 26.07.2008 02.08.2008 02.08.2008 17.07.2018	Шедько М.Б. То же » » » » »	
2	18	10	3	3		PE LE CU CU CU MY LE LE	р. Тумнин, Хабаровский край р. Большой Омокой, о. Большой Шантар р. Большой Омокой, о. Большой Шантар р. Большой Анаур, о. Большой Шантар оз. Лисье, о. Феклистова р. Оленья, о. Большой Шантар оз. Азабачье, Камчатка оз. Азабачье, Камчатка	10.09.2012 21.08.2010 21.08.2010 12.08.2010 20.08.2010 23.08.2010 21.07.2014 11.10.2022	Миронова Т.Н. Шедько С.В. То же » » » Шедько М.Б. Паренский В.А.	
	3	5	3	4		AB MY MY MA NE SH LE MA MY AL	р. Радуга, Камчатка оз. Азабачье, Камчатка р. Радуга, Камчатка оз. Азабачье, Камчатка оз. Кроноцкое, Камчатка оз. Кроноцкое, Камчатка р. Утхолок, Камчатка р. Утхолок, Камчатка р. Утхолок, Камчатка о. Диско, Гренландия	20.07.2014 26.08.2007 21.08.2007 21.07.2014 13.08.2011 05.08.2011 22.09.2007 22.09.2007 22.09.2007 06.09.2006	Шедько М.Б. Паренский В.А. Шедько М.Б. Паренский В.А. Паренский В.А. Шедько М.Б. Соколов С.Г. То же » » » Jørgensen T.R.	

Примечание. * SST – *Salmincola stellata*; SMR – *S. markewitschi*; SCR – *S. carpiotis*; SCL – *S. californiensis*; SED – *S. edwardsii*. ** AL – *Salvelinus alpinus*; AB – *S. albus* Glubokovsky, 1977; CU – *S. curilus*; LE – *S. leucomaenis*; MA – *S. malma* (Walbaum, 1792); SH – *S. schmidti* Viktorovsky, 1978; MS – *Oncorhynchus masou*; NE – *O. nerka*; MY – *Parasalmo mykiss*; PE – *Parahucho perryi*.

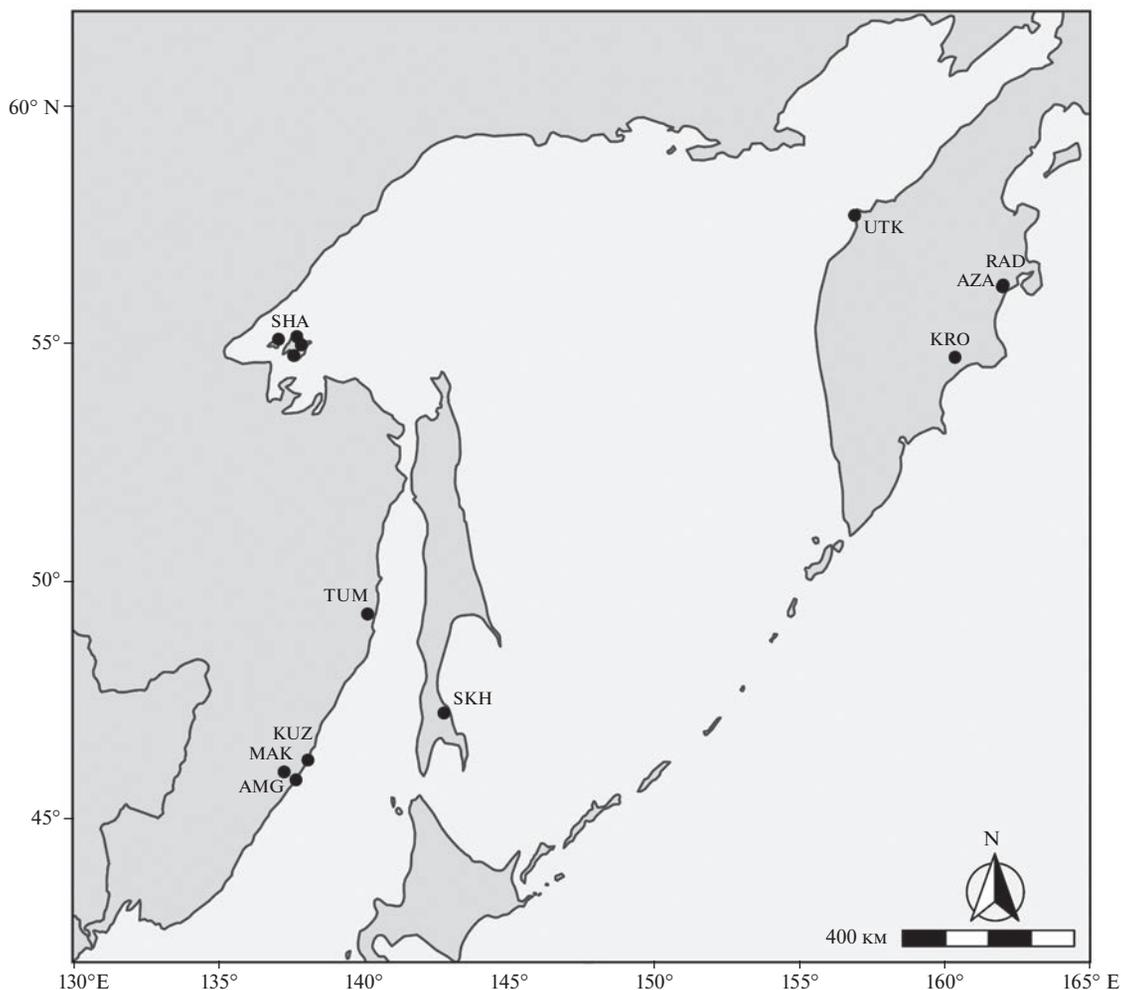


Рис. 1. Географическое расположение выборок копепод *Salmincola* с Дальнего Востока России. Код выборки см. табл. 1.

GenBank ($n = 12$) и публичного портала базы BOLD [13] ($n = 23$). Эти образцы были сняты с трех видов лососевых рыб – кунджи (GenBank: LC713314–LC713325), озерной палии *Salvelinus namaycush* (Walbaum, 1792) (BOLD: ZOOPS448-19 – OOPS451-19), американской ручьевой палии *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814) (GenBank: OQ355023–OQ355029, BOLD: ZOOPS266-19–ZOOPS270-19), а также одного вида из форелевого хозяйства – микижи (BOLD: ZOOPS117-18, ZOOPS118-18, ZOOPS442-19–ZOOPS446-19). Копеподы с этих хозяев значатся в вышеуказанных генетических базах данных как *S. cf. markewitschi*, *S. siscowet* (Smith, 1874), *S. edwardsii* и *S. californiensis*. Вместе с дополнительным материалом размерность итоговой матрицы данных составила 126 последовательностей на 654 нуклеотидные позиции.

Филогенетическое дерево строили методом максимального правдоподобия (ML) с помощью программы IQ-TREE v. 2.2 [31, 32] при использовании оптимальных моделей нуклеотидных замеще-

ний (TN + F + I и K3Pu + F + G4), подобранных в указанной программе для двух подразделений нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *COI*: 1) первой и второй, а также 2) третьей позиции кодонов. Устойчивость ветвлений ML-дерева оценивалась в 2000 псевдослучайных репликах быстрого [33] бутстрепа.

Молекулярное датирование филогении проведено в рамках байесовского подхода с помощью пакета программ BEAST 1.8.4 [34] при следующих условиях: акты видообразования – в соответствии с распределением Юла (использованы не все 126 последовательностей, а двенадцать, характеризующих основные клады *Salmincola*); модель молекулярных часов – одна и та же скорость нуклеотидных замен для разных ветвей дерева (различие между оценками правдоподобия, полученными для аддитивного и ультраметрического ML-деревьев, оказалось статистически не значимым: $\Delta \ln L = 7.14$, $P = 0.16$; расчеты проводились в программе PAUP 4.0 [35] – команда “clockChecker”); модель

Таблица 2. Межрегиональная дифференциация копепод *Salmincola* по фрагменту гена *COI*

Вид/Регион	Нуклеотидное разнообразие (p -расстояние)	Нетто-расстояние* между выборками	F -статистика** (P)
<i>S. markewitschi</i>			
Шантары ($n = 18$)	0.0006 ± 0.0005	0.0010 ± 0.0006	0.42 (0.0003)
Камчатка ($n = 6$)	0.0066 ± 0.0020		
<i>S. carpionis</i>			
Шантары ($n = 17$)	0.0013 ± 0.0008	0.0022 ± 0.0009	0.28 (0.0003)
Камчатка ($n = 7$)	0.0064 ± 0.0020		
<i>S. californiensis</i>			
Приморье ($n = 8$)	0.0053 ± 0.0014	0.0073 ± 0.0026	0.36 (0.0000)
Камчатка ($n = 9$)	0.0124 ± 0.0022		

Примечание. * – уравнение 10.21 в [36], расстояние рассчитано в программе SENDBS [37]; ** – получена исходя из частот гаплотипов по результатам AMOVA в программе Arlequine v. 3.5.2.2 [38].

нуклеотидных замещений для подразделений матрицы данных – TN + F + I и TN + F + G4 (использована вместо K3Pc + F + G4); протяженность байесовского анализа – 300000000 циклов с отбором каждого двухтысячного шага и отжигом первых 30% шагов. Для привязки ультраметрического дерева к абсолютной шкале времени было использовано два калибровочных интервала (см. ниже). Эффективный размер выборок (Effective Sample Size, ESS) для всех контролируемых параметров байесовского анализа был 2000 и более. С целью проверки результатов на воспроизводимость анализ проводился в нескольких повторениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего у девятиста одной исследованной нами копеподы был выявлен 41 вариант различающихся гаплотипов фрагмента гена *COI* с максимальным уровнем попарных различий 0.183 нуклеотидных замен на позицию (p -расстояние). На ML-дереве эти гаплотипы сформировали пять высоко дифференцированных клад, соответствующих пяти рассматриваемым видам (рис. 2). Средние расстояния между членами этих клад варьировали от 0.139 ± 0.014 в паре *S. markewitschi*–*S. carpionis* до 0.179 ± 0.015 в паре *S. stellata*–*S. californiensis*. Внутривидовое нуклеотидное разнообразие фрагмента гена *COI* оказалось намного ниже и составило 0.013 ± 0.003 и 0.015 ± 0.003 для *S. californiensis* и *S. edwardsii*. Эти два вида паразитических копепод населяют жаберную полость, жаберные лепестки и плавники хозяина. У видов, локализуемых в ротоглоточной полости хозяев, оценки нуклеотидного разнообразия составили еще меньшие величины – 0.002 ± 0.001 , 0.004 ± 0.001 и 0.005 ± 0.001 для *S. stellata*, *S. markewitschi* и *S. carpionis* соответственно.

Сравнение трех пар выборок копепод *Salmincola* из разных районов Дальнего Востока России выявило существенные межрегиональные отличия по составу гаплотипов, проявляющиеся в умеренно высоких значениях F -статистики (табл. 2). Дисперсионный анализ, проведенный на основе рассмотрения попарных нуклеотидных различий, привел к практически тем же результатам – F -статистика варьировала в интервале 0.41–0.44 ($P = 0.000$ – 0.001). Нетто-расстояние между выборками *S. californiensis* заметно больше расстояний между выборками двух других видов. Это может быть вызвано тем, что выборки *S. californiensis* были получены не с одного, а с двух разных хозяйев – микижи (Камчатка) и сими *Oncorhynchus masou* (Brevoort, 1856) (Приморье). Любопытно, что для всех трех видов *Salmincola* наибольшее нуклеотидное разнообразие наблюдалось в выборках, собранных на Камчатке (табл. 2).

Гаплотип фрагмента гена *COI*, выявленный у копеподы *S. carpionis*, собранной с арктического гольца *Salvelinus alpinus* (L.) о-ва Диско, расположенного неподалеку от побережья Гренландии ($69^{\circ}28'59.2''$ N $53^{\circ}56'45.6''$ W), мало чем отличался от гаплотипов этой копеподы, собранных с различных видов гольцов *Salvelinus* на Дальнем Востоке России. Наибольшее сходство с ним демонстрировал гаплотип, найденный у южной мальмы *Salvelinus curilus* (Pallas, 1864) с Шантарских о-вов – $p = 0.009$. Столь малые различия образцов, собранных из мест, удаленных друг от друга на более чем 6000 км, свидетельствуют о сравнительной молодости современного ареала *S. carpionis*.

Последовательности фрагмента гена *COI*, обнаруженные у копепод, снятых с кунджи Японских островов, вошли в состав клады копеподы *S. markewitschi* (рис. 2). Это подтверждает правильность включения о-вов Хоккайдо и Хонсю в ареал данного вида [24–26]. Последовательности

гольцов *Salvelinus* с Дальнего Востока России и нерки оз. Кроноцкого, 2) образцы *S. edwardsii* с восточного побережья Северной Америки, снятые с американской палии *S. fontinalis* и 3) *S. sis-cowet* с озерной палии *S. namaycush* из штата Мичиган. Столь высокие различия последовательностей фрагмента гена *COI* между этими субкладами указывают на необходимость ревизии вида, известного в настоящее время как *S. edwardsii* и имеющего циркумполярное распространение в Голарктике. В прошлом [4] в синонимы к *S. edwardsii* были сведены несколько номинальных видов, которые после повторного исследования их морфологии вполне могут оказаться самостоятельными видами. В частности, ранее были отмечены некоторые отличия азиатских *S. edwardsii* от североамериканских [4, 16].

Датировка дерева *Salmincola* основывалась на факте высокой степени специфичности этих паразитов [3–5, 16–26], что позволило принять допущение о том, что диверсификация *Salmincola* в целом повторяла диверсификацию линий их хозяев и происходила без существенного лага во времени.

В каркас молекулярного датирования филогении *Salmincola* была положена хронограмма филогенетического дерева Salmonidae, полученная нами ранее, исходя из анализа полных и частичных митогеномов [39]. Для датировки использовались два калибровочных интервала — вероятный возраст кроны всего дерева *Salmincola* и возраст кроны группы видов *edwardsii*-подобных копепоид. В качестве априорной вероятности (приора) возраста кроны всего дерева *Salmincola* было взято смещенное логнормальное распределение: логарифм средней равен 1.0, логарифм стандартного отклонения — 0.72, смещение — 19. Это в результате устанавливало 5% и 95%-ный квантили возраста кроны *Salmincola* в двадцать (примерное время завершения обособления следующих линий хозяев копепоид *Salmincola* — *Parahucho*, *Salvelinus*, *Parasalmo* и *Oncorhynchus* [39]) и двадцать восемь (примерный возраст линии Salmoninae, включающей в себя *Salmo*, *Salmothymus*, *Parahucho*, *Salvelinus*, *Parasalmo* и *Oncorhynchus* [39]) млн лет соответственно. Приор возраста кроны группы видов *edwardsii*-подобных копепоид был принят аналогичным образом: логарифм средней — 1.7, логарифм стандартного отклонения — 0.7, смещение — 2.5. Это в результате давало 5% и 95%-ный квантили возраста кроны группы видов *edwardsii* в четыре (примерное время завершения обособления основных линий в кроне *Salvelinus*: *S. fontinalis*; *S. leucomaenis*; *S. levanidovi* Chereshev, Skopets et Gudkov, 1989; *S. namaycush*; а также линии, включающей в себя альпиноидных и мальмоидных гольцов [39]) и двадцать (примерный возраст ствола *Salvelinus* [39]) млн лет соответственно.

Необходимо указать на то, что в некоторых работах по датированию филогении Salmonidae ([40], к примеру) можно встретить несколько большие оценки возраста ветвлений вкладах тихоокеанских лососей и форелей, а также гольцов, чем те, которым мы следовали [39]. По нашему мнению, причина различий заключается в некорректной оценке возраста опорных ветвлений в этой части дерева Salmonidae. Возраст ископаемого *Smilodonichthys rastrosus* Cavender et Miller, 1972 был интерпретирован как возраст кроны линии тихоокеанских лососей и форелей, а возраст ископаемого *Oncorhynchus ketopsis* Eiting et Smith, 2007 — как время, прошедшее с момента дивергенции *O. keta* (Walbaum, 1792) и *O. gorbuscha* (Walbaum, 1792) [40].

Некоторые характеристики *Smilodonichthys* указывают на его близость к линии тихоокеанских лососей и форелей [41]. Однако строение челюстей, а также жаберного аппарата исключает возможность объединения этого ископаемого вида в одну кладу [40] с видами *O. masou*, *O. keta* и *O. gorbuscha*. Соответственно, возраст *Smilodonichthys* может использоваться лишь как оценка возраста ствола тихоокеанских лососей и форелей.

Oncorhynchus ketopsis морфологически сходен с видами *Oncorhynchus*, но включение его в одну кладу вместе с *O. keta* и *O. gorbuscha* [40] не обосновано. Ископаемый вид отличается от указанных и других видов *Oncorhynchus* строением жаберного аппарата ([42]: 421). Поэтому возраст *O. ketopsis* может использоваться лишь в качестве оценки возраста кроны тихоокеанских лососей в целом. Наш вариант молекулярной датировки этой части дерева Salmonidae [39] учитывает оба этих обстоятельства.

Результат молекулярного датирования филогении видов *Salmincola* приведен на рис. 3. Согласно данной хронограмме, дивергенция линий *Salmincola* произошла в миоцене и завершилась в раннем плиоцене. Интересная ситуация складывается относительно возраста линий двух специфичных для гольцов паразитических копепоид — *S. carpionis* и *S. markewitschi*. Первый из этих видов является специфическим для рода *Salvelinus* и обитает на широком круге хозяев — прежде всего на разных видах гольцов из альпиноидной и мальмоидной групп. У кунджи этот вид не найден [16, 18–20]. Второй вид копепоид является специфичным на уровне вида и известен только с кунджи [16, 24–26]. Из рис. 3 можно видеть, что возраст линии *S. markewitschi* составляет около 11.6 млн лет. Это заметно больше возраста линии ее хозяина кунджи — порядка 6 (4.1–8.2) млн лет [39]. Это противоречие можно объяснить тем, что линия *S. markewitschi* изначально обитала на каком-то из вымерших к настоящему времени видов гольцов.

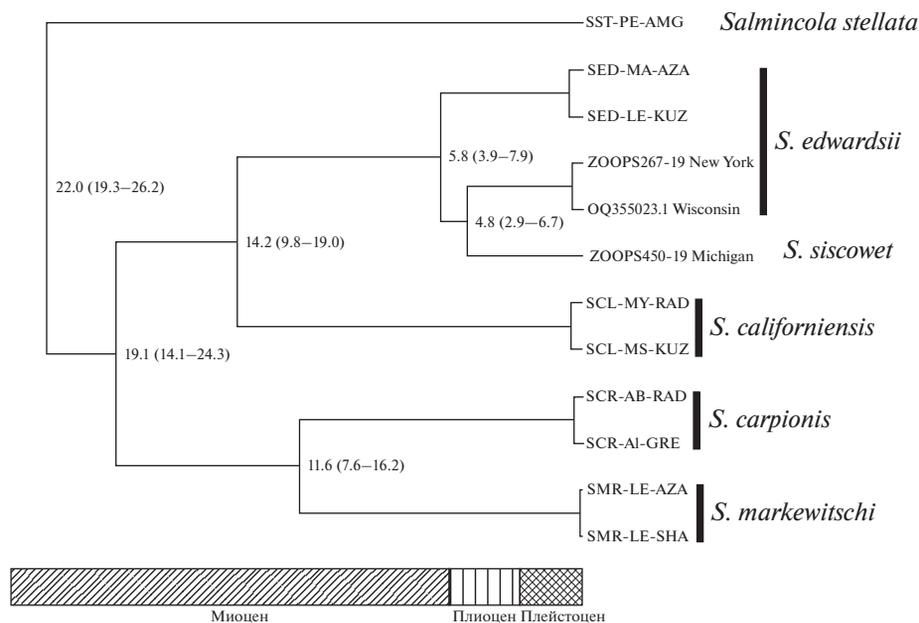


Рис. 3. Байесовская хронограмма филогении копепоид *Salmincola*, построенная на основе анализа фрагмента гена *COI*. Цифры – эволюционный возраст в млн лет (в скобках – 95%-ные интервалы наивысшей апостериорной плотности).

Ее вселение на кунджу, видимо, произошло позднее, после возникновения этого вида гольцов.

Полученная по результатам байесовского датирования оценка скорости эволюции фрагмента гена *COI* у *Salmincola* оказалась равной 0.0228 ± 0.0052 (95%-ный интервал наивысшей апостериорной плотности HPD: 0.0132–0.033) замен на млн лет на линию (в % различий на млн лет: 4.56 ± 1.01). Без разбиения матрицы данных на два подразделения (в этом случае, оптимальная модель – HKY + F + I + G4) этот показатель составил 0.0250 ± 0.0014 (95%-ный интервал HPD: 0.0137–0.038). Эти оценки близки к нижней границе оценок скорости эволюции фрагмента гена *COI*, рассчитанных при использовании модели TN93 + G для различных групп морских беспозвоночных: 0.022–0.023 (Mollusca) и 0.036–0.043 (Arthropoda) замен на позицию на млн лет на линию [43].

Известно, что оценки скорости эволюции мтДНК, полученные при рассмотрении родословных внутри популяции, отличаются от оценок, рассчитанных для давно разделившихся видов [44]. Поэтому используемая калибровка скорости эволюции должна, по возможности, находиться в соответствии с масштабом времени исследуемых процессов. Для решения этой задачи применительно к *Salmincola* нами были использованы данные, полученные для *S. edwardsii* из оз. Кроноцкого. Аналогично тому, как это было сделано ранее для гольцов *Salvelinus* [45], скорость нуклеотидных замен фрагмента гена *COI* у копепоид была рассчитана, исходя из накопленных с момента изоляции нуклеотидных замен [46]. Допуская,

что наиболее часто представленный гаплотип является предковым, были подсчитаны отличия остальных (производных) гаплотипов с учетом частот их встречаемости. Таким образом была получена оценка среднего числа накопленных нуклеотидных различий в расчете на ген – $\rho = 0.667$. Доверительный интервал показателя ρ (95%: 0.167–1.333) был установлен в 500 циклах бутстрепа, произведенных с помощью пакета boot [47]. Деление значения ρ на длину фрагмента *COI* и время изоляции лососевых рыб, обитающих в оз. Кроноцкое (12000 лет [48, 49]), дало искомую оценку скорости нуклеотидных замен на уровне родословных внутри популяции $\mu = 0.0849$ (95%-ный интервал HPD: 0.0212–0.170) замен на позицию на млн лет на линию. Полученная оценка практически идентична той, что установлена для гена *COI* одного из видов изопод (Crustacea) при исследовании популяции, сформировавшейся менее 10000 лет назад – 0.087 (95%-ный доверительный интервал: 0.042–0.12) [50]. Несколько меньшая скорость эволюции *COI* была вычислена для креветки *Haptosquilla* (Crustacea) при рассмотрении временного отрезка менее 20000 лет – 0.066 (0.021–0.118) [51].

Применив к нетто-расстояниям из табл. 2 оценку скорости нуклеотидных замен на уровне родословных (μ), можно найти, что первые две из перечисленных в табл. 2 пары популяций разделились в голоценовое время – 5800–13000 лет назад, а последняя несколько раньше – порядка 43000 лет назад.

В заключение подчеркнем, что установленная сравнительно высокая изменчивость фрагмента митохондриального гена *COI* делает этот маркер удобным инструментом как для разработки систематики и филогении копепод *Salmincola* и *Lernaeopodidae* на видовом и родовом уровнях, так и для анализа дифференциации их популяций. Исследования копепод *Salmincola* позволят восстановить историю и характер взаимоотношений этих паразитов и их хозяев – лососевых рыб *Salmonidae*. Если в отношении хозяев необходимый филогенетический каркас можно признать уже существующим, то для построения обоснованной филогении паразитических копепод *Salmincola* (как и *Lernaeopodidae* в целом) предстоит потратить еще немало усилий. Хочется надеяться, что наша работа поможет исследователям сориентироваться в подборе адекватного набора филогенетических маркеров.

Авторы глубоко признательны С.Г. Соколову, В.А. Паренскому, Т.Н. Мироновой и Т.Р. Jörgsen за предоставленные образцы копепод. Результаты получены с использованием оборудования ЦКП “Дальневосточный вычислительный ресурс” ИАПУ ДВО РАН (<https://www.cc.dvo.ru>).

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031500274-4).

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. Bernot J.P., Boxshall G.A., Crandall K.A. A synthesis tree of the Copepoda: Integrating phylogenetic and taxonomic data reveals multiple origins of parasitism // *Peer J*. 2021. V. 9. e12034. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.12034/SUPP-2>
2. Walter T.C., Boxshall G. World of Copepods Database. *Lernaeopodidae* Milne Edwards, 1840. 2023. World Register of Marine Species. Просмотрено 12.04.2023. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=135525>
3. Kabata Z. Parasitic Copepoda of British Fishes. London: The Ray Society, 1979. V. 152. 468 p.
4. Kabata Z. Revision of the genus *Salmincola* Wilson, 1915 (Copepoda: Lernaeopodidae) // *J. Fish. Res. Board Can.* 1969. V. 26. P. 2987–3041. <https://doi.org/10.1139/z86-276>
5. Kabata Z. Copepoda and Branchiura // *Guide to the Parasites of Fishes of Canada. Part II. Crustacea* / Eds Margolis L., Kabata Z. Ottawa: Dept. Fisheries and Oceans, 1988. P. 3–128.
6. Hare G.M., Frantsi C. Abundance and potential pathology of parasites infecting salmonids in Canadian Maritime hatcheries // *J. Fish. Res. Board Can.* 1974. V. 31. P. 1031–1036. <https://doi.org/10.1139/f74-11>
7. Bell G.R., Margolis L. The fish health program and the occurrence of fish diseases in the Pacific region of Canada // *Fish Pathology*. 1976. V. 10. № 2. P. 115–122. <https://doi.org/10.3147/jsfp.10.115>
8. Kabata Z., Cousens B. Host-parasite relationships sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *Salmincola californiensis* (Copepoda: Lernaeopodidae) // *J. Fish. Res. Board Can.* 1977. V. 34. P. 191–202. <https://doi.org/10.1139/f77-02>
9. Johnson K.A., Heindel J.A. Efficacy of manual removal and ivermectin gavage for control of *Salmincola californiensis* (Wilson) infestation of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), captive broodstocks // *J. Fish Diseases*. 2001. V. 24. P. 197–203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00279.x>
10. Roberts R.J., Johnson K.A., Casten M.T. Control of *Salmincola californiensis* (Copepoda: Lernaeopodidae) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): A clinical and histopathological study // *J. Fish Diseases*. 2004. V. 27. P. 73–79.
11. Piasecki W., Goodwin A.E., Eiras J.C., Nowak B.F. Importance of Copepoda in freshwater aquaculture // *Zool. Studies*. 2004. V. 43. № 2. P. 193–205.
12. Mitro M. Brook trout, brown trout, and ectoparasitic copepods *Salmincola edwardsii*: Species interactions as a proximate cause of brook trout loss under changing environmental conditions // *Transactions of the Am. Fisheries Society*. 2016. V. 145. № 6. P. 1223–1233. <https://doi.org/10.1080/00028487.2016.1219676>
13. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>) // *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7. № 3. P. 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
14. Маркевич А.П. Паразитические веслоногие рыб СССР. Киев: Изд-во АН УССР, 1956. 260 с.
15. Гусев А.В. Тип Членистоногие – Arthropoda // *Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т. 3. Паразитические многоклеточные (Вторая часть)*. Л.: Наука, 1987. С. 378–524.
16. Шедько М.Б., Шедько С.В. О паразитических копеподах рода *Salmincola* (Lernaeopodidae) от дальневосточных гольцов *Salvelinus* (Salmonidae) с описанием нового вида *Salmincola markewitschi* sp. n. // *Зоол. журн*. 2002. Т. 81. № 2. С. 141–153.
17. Шедько М.Б., Шедько С.В. Распространение и морфология *Salmincola stellatus* (Copepoda: Lernaeopodidae) от сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Salmonidae) из Приморья // *Паразитология*. 2003. Т. 37. Вып. 1. С. 60–68.
18. Шедько М.Б. Фауна паразитических копепод рода *Salmincola* (Lernaeopodidae) рыб Камчатки // *Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Доклады V научной конф. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс*, 2005. С. 128–139.
19. Шедько М.Б., Поспехов В.В., Атрашкевич Г.И. Новые данные по фауне пресноводных паразитических копепод рода *Salmincola* (Copepoda: Lernaeopodidae) рыб северо-западной части побережья Охот-

- ского моря // Чтения памяти В.Я. Леванидова. Вып. 3. Владивосток: Дальнаука, 2005. С. 421–434.
20. Шедько М.Б., Шедько С.В., Виноградов С.А. Фауна пресноводных паразитических копепод семейства Lernaeopodidae (Crustacea: Copepoda) рыб острова Сахалин // Растительный и животный мир острова Сахалин (Материалы Международного сахалинского проекта). Часть 2. Владивосток: Дальнаука, 2005. С. 52–63.
 21. Соколов С.Г., Шедько М.Б., Протасова Е.Н., Фролов Е.В. Паразиты рыб внутренних водоемов острова Сахалин // Растительный и животный мир островов северо-западной части Тихого океана (Матер. Междунар. Курильского и Междунар. сахалинского проектов). Владивосток: Дальнаука, 2012. С. 179–216.
 22. Kabata Z. Redescriptions of and comments on four little-known Lernaeopodidae (Crustacea: Copepoda) // Can. J. Zool. 1986. V. 64. P. 1852–1859. <https://doi.org/10.1139/z86-276>
 23. Nagasawa K., Urawa S. New records of the parasitic copepod *Salmincola stellatus* from Sakhalin taimen (*Hucho perryi*) in Hokkaido, with a note on its attachment site // Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery. 1991. V. 45. P. 57–59.
 24. Nagasawa K. *Salmincola markewitsehi* (Copepoda: Lernaeopodidae) parasitic on whitespotted char, *Salvelinus leucomaenis*, in a mountain stream of Honshu Island, Central Japan // Species Divers. 2020. V. 25. № 2. P. 369–375. <https://doi.org/10.12782/specdiv.25.369>
 25. Nagasawa K. Two Copepods *Salmincola edwardsii* and *Salmincola markewitschi* (Lernaeopodidae) parasitic on chars (*Salvelinus* spp.) reared in a salmon museum, Northern Japan // Species Divers. 2021. V. 26. № 2. P. 137–143. <https://doi.org/10.12782/specdiv.26.137>
 26. Nagasawa K., Urawa S. Occurrence of *Salmincola edwardsii* (Olsson, 1869) and *Salmincola markewitschi* Shedko & Shedko, 2002 (Copepoda: Lernaeopodidae) on stream-dwelling salmonids in eastern Hokkaido, Japan, with observations on the morphology of the copepods // Crustac. Res. 2022. V. 51. P. 91–101. https://doi.org/10.18353/crustacea.51.0_91
 27. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
 28. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994. V. 3. № 5. P. 294–299.
 29. Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K. The Staden Package, 1998 // Bioinform. Methods Protoc. 2000. V. 132. P. 115–130. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
 30. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. № 2. P. 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
 31. Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. № 1. P. 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 32. Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q. Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices // Syst. Biol. 2016. V. 65. № 6. P. 997–1008. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>
 33. 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>
 34. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. № 8. P. 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
 35. Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4.0. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc., 2002.
 36. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
 37. Nei M., Jin L. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations // Mol. Biol. Evol. 1989. V. 6. № 3. P. 240–300. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040547>
 38. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resources. 2010. V. 10. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
 39. Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. Филогения лососевых рыб (Salmoniformes: Salmonidae) и ее молекулярная датировка: анализ мтДНК-данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 718–734. <https://doi.org/10.7868/S0016675813060118>
 40. Lecaudey L.A., Schliwen U.K., Osinov A.G. et al. Molecular phylogenetics and evolution inferring phylogenetic structure, hybridization and divergence times within Salmoninae (Teleostei: Salmonidae) using RAD-sequencing // Mol. Phylogenet. Evol. 2018. V. 124. P. 82–99. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.022>
 41. Cavender T.M., Miller R.R. *Smilodonichthys rastrousus*, a new Pliocene salmonid fish from western United States // Bull. of the Oregon Museum of Natural History. 1972. V. 18. P. 1–44.
 42. Eiting T.P., Smith G.R. Miocene salmon (*Oncorhynchus*) from Western North America: Gill Raker evolution correlated with plankton productivity in the Eastern Pacific // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 2007. V. 249. № 3–4. P. 412–424. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2007.02.011>
 43. Loeza-Quintana T., Carr C.M., Khan T. et al. Recalibrating the molecular clock for Arctic marine invertebrates based on DNA barcodes // Genome. 2019. V. 62. № 3. P. 200–216. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0107>
 44. Ho S.Y.W., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J. Time dependency of molecular rate estimates and sys-

- tematic overestimation of recent divergence times // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. № 7. P. 1561–1568. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi145>
45. Шедько С.В. Скорость эволюции митохондриального гена цитохрома *b* согласно анализу недавней (около 12000 лет) изоляции гольцов *Salvelinus* озера Кроноцкого // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 12. С. 1466–1470. <https://doi.org/10.1134/S0016675819090157>
46. Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H.-J. Origin and evolution of native american mtDNA variation: A reappraisal // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. № 4. P. 935–945.
47. Canty A., Ripley B. boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-20. 2017. 117 p.
48. Мелекесцев И.В., Брайцева О.А., Эрлих Э.Н., Кожемяка Н.Н. Вулканические горы и равнины // История развития рельефа Сибири и Дальнего Востока. Камчатка, Курильские и Командорские острова. М.: Наука, 1974. С. 162–233.
49. Гущенко И.И. Вулкан Кроноцкий // Действующие вулканы Камчатки. М.: Наука, 1991. Т. 2. С. 52–61.
50. Harigai W., Saito A., Suzuki H., Yamamoto M. Genetic diversity of *Ligidium* isopods in Hokkaido and Niigata, Northern Japan, based on mitochondrial DNA analysis // *Zoolog. Sci.* 2020. V. 37. № 5. P. 417–428. <https://doi.org/10.2108/zs200017>
51. Crandall E.D., Sbrocco E.J., De Boer T.S. et al. Expansion dating: Calibrating molecular clocks in marine species from expansions onto the Sunda Shelf following the last glacial maximum // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 29. № 2. P. 707–719. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSR227>

DNA Identification of Parasitic Copepods *Salmincola* (Copepoda, Siphonostomatoida, Lernaepodidae): Variability and Rate of Evolution of the Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I Gene

S. V. Shedko^{a, *}, M. B. Shedko^a, I. L. Miroshnichenko^a, and G. A. Nemkova^a

^aFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: shedko@biosoil.ru

The barcode fragment of the *COI* gene was sequenced in 91 specimens of five species of parasitic *Salmincola* copepods, sampled from salmonids mainly from the Russian Far East: *S. californiensis* (mykiss and masu salmon) and *S. edwardsii* (various species of chars, sockeye salmon from Lake Kronotskoe), *S. carpionis* (various species of chars), *S. markewitschi* (whitespotted char), *S. stellata* (Sakhalin taimen). A total of 41 haplotypes were found with a maximum level of differences of 0.183 nucleotide substitutions per position. The distance between species varied from 0.139 ± 0.014 in the *S. markewitschi*–*S. carpionis* pair to 0.179 ± 0.015 in the *S. stellata*–*S. californiensis* pair. The intraspecific nucleotide diversity of the *COI* gene fragment is much lower: for *S. californiensis* and *S. edwardsii*, inhabiting the gill cavity and fins of the host – 0.013 ± 0.003 and 0.015 ± 0.003 , and for *S. stellata*, *S. markewitschi*, and *S. carpionis*, localized in the buccal cavity of the hosts – 0.002 ± 0.001 , 0.004 ± 0.001 , and 0.005 ± 0.001 , respectively. A comparison of samples of three *Salmincola* copepod species from different regions of the Russian Far East revealed a significant ($F_{st} = 0.28–0.42$, $P \ll 0.001$) genetic subdivision. Three subclades of *edwardsii*-like copepods – *S. edwardsii* from the Russian Far East, *S. edwardsii* from the American brook char of eastern North America, and *S. siscowet* from the lake char of Michigan (*COI* sequences of copepods from the last two groups are taken from genetic databases) – differed from each other by an average of 9.3–10.9% nucleotide positions, which means the need for a taxonomic revision of *S. edwardsii*. According to the molecular dating carried out, the divergence of *Salmincola* lineages started in the Miocene and ended in the early Pliocene. The phylogenetic substitution rate was 0.0228 (95% interval: 0.0132–0.033) nucleotide substitutions/position/million years/lineage. The rate of nucleotide substitutions at the population level is 3.7 times higher – 0.0849 (0.0212–0.170). The high level of variability of the *COI* gene fragment makes this marker a useful tool both for developing the taxonomy and phylogeny of *Salmincola* and Lernaepodidae copepods at the species and genus levels, and for analyzing the differentiation of their populations.

Keywords: mitochondrial DNA, molecular systematics, molecular clock.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ rs2295080 И rs1883965 ГЕНА *MTOR* С РАЗВИТИЕМ И ТЕЧЕНИЕМ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ

© 2023 г. И. Е. Мальшева¹, *, Л. В. Топчиева¹, Э. Л. Тихонович²

¹Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

²Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, 185019 Россия

*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 01.05.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Цель исследования – изучение ассоциации полиморфных вариантов rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* с риском развития саркоидоза легких. В исследование включено 253 человека (122 больных с диагнозом морфологически верифицированный саркоидоз с поражением легких (средний возраст – 41.00 ± 12.56 года) и 131 здоровый человек (контрольная группа) (средний возраст – 44.00 ± 14.23 года)). В исследование включены жители Республики Карелия. В исследуемых группах проанализировано распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR*. Генотипирование проводили с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. Уровень транскриптов гена *MTOR* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) больных саркоидозом легких и здоровых людей оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Установлено статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК гена *MTOR* в ЛПК больных саркоидозом легких по сравнению с контрольной группой ($p = 0.007$). Отмечено снижение количества транскриптов указанного гена у пациентов, получающих терапию по сравнению с пациентами без терапии ($p = 0.025$). Статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе не установлено ($\chi^2 = 0.196$, d.f. = 1, $p = 0.658$ и $\chi^2 = 0.637$, d.f. = 2, $p = 0.728$) и ($\chi^2 = 0.034$, d.f. = 1, $p = 0.855$ и $\chi^2 = 0.051$, d.f. = 2, $p = 0.975$) соответственно. Повышенный уровень экспрессии гена *MTOR* в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом легких может свидетельствовать о вовлечении указанного гена в патогенез данного заболевания. Полиморфные маркеры rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* не связаны с риском развития саркоидоза легких. Вероятно, повышение уровня экспрессии гена *MTOR* у больных саркоидозом легких обусловлено развитием воспаления.

Ключевые слова: саркоидоз легких, анализ ПЦР-ПДРФ, ген *MTOR*, аллельный полиморфизм, экспрессия.

DOI: 10.31857/S0016675823100090, **EDN:** ZVGTIM

Установлена важная роль PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути в регуляции пролиферации, клеточного роста, выживания клеток, дифференцировки и др. [1]. Неконтролируемая активация и нарушение регуляции mTOR-сигнального пути может привести к развитию различных патологических состояний, среди которых злокачественные новообразования, дегенеративные заболевания, диабет 2-го типа и другие патологии, в том числе саркоидоз [2, 3]. Данное заболевание относится к системным гранулематозам неясной этиологии и характеризуется образованием в различных органах эпителиоидно-клеточных гранул [4]. Саркоидные гранулемы представляют собой компактное

скопление иммунных клеток – макрофагов и производных этих клеток – гигантских многоядерных клеток, окруженных лимфоцитами [5]. Патологический процесс наиболее часто (до 90%) развивается в легких. В дальнейшем гранулемы могут рассасываться или претерпевать фиброзные изменения, что может способствовать развитию дыхательной недостаточности [4].

Одним из ключевых компонентов PI3K/Akt/mTOR-сигнального каскада является серин-треонинкиназа mTOR (mechanistic target of rapamycin; механическая мишень для рапамицина). Данный фермент принадлежит к семейству киназ, родственных фосфоинозитол-3-кина-

зе (PI3K), регулирующих различные клеточные сигналы. Это осуществляется посредством фосфорилирования многочисленных субстратов в различных метаболических реакциях. mTOR входит в состав белковых комплексов mTORC1 и mTORC2 [6, 7]. В миелоидных клетках (макрофагах) мышей базальная (конститутивная) активность комплекса mTORC1 приводит к спонтанному образованию гранул в различных органах. Более того, лечение этих мышей ингибитором и иммунодепрессантом mTOR – сиролимусом (рапамицином), приводит к растворению гранул [3, 8].

Протеинкиназа mTOR кодируется геном *MTOR* (mechanistic target of rapamycin kinase). Установлено, что большинство однонуклеотидных замен в гене *MTOR* локализуется в интронах, функциональные эффекты большинства из них неизвестны [9]. В последнее время все большее число исследований сосредоточено на изучении однонуклеотидных замен в промоторной области гена, которые, как установлено, влияют на способность связывания с некоторыми транскрипционными факторами и оказывают влияние на последующую транскрипцию гена [10]. По данным литературы к таким аллельным полиморфизмам относятся rs2295080. Что касается полиморфного варианта rs1883965 указанного гена, то он принадлежит к интронным SNP (Single nucleotide polymorphism), которые могут влиять на транскрипцию гена *MTOR*, модификацию и метаболизм его мРНК [11]. Вероятно восприимчивость людей к развитию саркоидоза легких может быть обусловлена носительством аллельных вариантов гена *MTOR* по указанным полиморфным маркерам и генетически обусловленным уровнем его экспрессии. Показана ассоциация упомянутых выше полиморфных вариантов с онкологическими заболеваниями, болезнью коронарных артерий, возрастной макулярной дегенерацией и другими патологиями [12–14]. Сведения о влиянии полиморфных маркеров rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* на развитие и прогрессирование патологического процесса при саркоидозе легких в литературе отсутствуют. Также малочисленны данные об уровне экспрессии этого гена у больных саркоидозом легких. Поэтому цель настоящего исследования заключалась в изучении уровня транскриптов гена *MTOR* у больных саркоидозом легких, а также связи rs2295080 и rs1883965 с риском развития данного заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 253 человека (131 донор из группы контроля (здоровые люди) (ср. возраст – 43.0 ± 14.23 года) и 122 больных саркоидозом легких (ср. возраст – 41.0 ± 12.56 года)). Диагноз саркоидоз легких установлен в соответствии с критериями на основе клинико-рентгенологических и лабораторных изменений, соответствовал между-

народным критериям выявления этого гранулематоза [15]. У всех пациентов (100%) саркоидоз был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. Пациенты с прогрессирующим течением болезни по данным рентгенологического и функционального исследования дыхания, при выраженных симптомах или внелегочных проявлениях саркоидоза получали кортикостероидную терапию по схеме. Больные саркоидозом легких со стабильным течением, при отсутствии активности данного заболевания находились без терапии. Длительность наблюдения больных саркоидозом легких от 1 года до 12 лет.

До проведения исследования от всех пациентов было получено добровольное информированное согласие. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 30 кг/м. Для проведения генетических исследований, в качестве материала, были использованы образцы венозной крови. Исследование выполнено с соблюдением этических норм согласно критериям Всемирной ассоциации медицинских редакторов (The World Association of Medical Editors – WAME), одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ “Республиканская больница им. В.А. Баранова” г. Петрозаводска, протокол № 96 от 11.07.2017.

Для выделения геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови использовали набор “Analytikjena” (Германия). Генотипирование полиморфных вариантов rs2295080 и rs1883565 гена *MTOR* осуществляли с помощью метода полимеразной реакции с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). ПЦР проводили на приборе iCycler iQ5 (“Bio-Rad”, США). Для амплификации использовали наборы “HS-Screen mix” и праймеры фирмы “Евроген” (Россия). Сиквенс праймеров указан в работе F. Bizhani и соавт. [16]. ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *FokI* для rs2295080 и *BfaI* для rs1883965 (1 ед. а.) в течение 5 ч при 37°C. В работе использованы эндонуклеазы рестрикции фирмы “Сибэнзим”, Россия. Затем фрагменты рестрикции разделяли с помощью 8%-ного ПААГ, окрашивали 1%-ным раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Уровень транскриптов гена *MTOR* анализировали в лейкоцитах периферической крови условно здоровых людей (27 человек, возраст 42 ± 3.65 года), больных находящимися на кортикостероидной терапии, которая проводилась по схеме [17] (15 человек, возраст 47 ± 5.23), больных без терапии (15 человек, 45 ± 4.35). Тотальную РНК (тотРНК)

из ЛПК выделяли с помощью реагента для выделения РНК PureZol (Bio-Rad). Для удаления остатков ДНК раствор тотРНК обрабатывали ДНКазой (“Сибэнзим”, Россия) (1 ед. а.) при 37°C в течение 30 мин. Для синтеза кДНК использовали набор “MMLV RT kit” (“Евроген”, Россия). Количество транскриптов гена *MTOR* в лейкоцитах периферической крови определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе “Light-Cycler” (Roche, Германия). Для амплификации использовали наборы “qPCRmix-HS SYBR” и праймеры фирмы “Евроген” (Россия). Последовательность праймеров для гена *MTOR* (прямой 5'-ttgcttgaggctactg-3'; обратный 5'-ctgacttgacttgattctg-3'). В качестве референсных генов использовали *18sRNA* [18] и *GAPDH* (праймеры: прямой 5'-gaagtggaaggtcggagtc-3' и обратный 5'-gaagatggatgggatttc-3'). ПЦР-РВ для каждого образца проводили не менее трех раз. Для дизайна праймеров использовали программу BeaconDesigner 5.0.

Для статистической обработки данных использовали пакет программ StatgraphicsCenturion XVI (version 16.1.11). Достоверность различий уровня транскриптов гена между группами оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Критерий χ^2 применяли при сравнении частот встречаемости аллелей и генотипов в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено значимое повышение количества транскриптов гена *MTOR* в лейкоцитах крови больных саркоидозом легких по сравнению с контрольной группой (рис. 1). Отмечено снижение уровня экспрессии мРНК гена *MTOR* в лейкоцитах периферической крови больных, получающих терапию по сравнению с пациентами без терапии ($p = 0.025$).

Изучали связь rs2295080 и rs1883965 с развитием саркоидоза легких. В табл. 1 представлены результаты распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе. Распределение генотипов по полиморфному маркеру rs2295080 гена *MTOR* соответствовало равновесию Харди–Вайнберга в группе больных саркоидозом легких ($\chi^2 = 0.33, p = 0.849$) и в контрольной группе ($\chi^2 = 2.21, p = 0.331$). Также не выявлено отклонения от равновесия Харди–Вайнберга в распределении

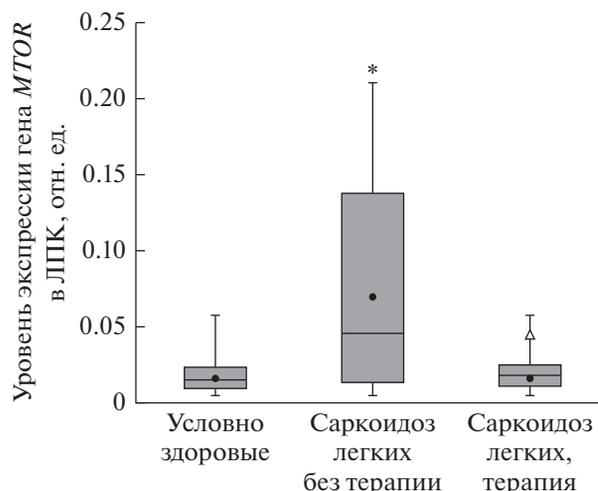


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *MTOR* в ЛПК условно здоровых доноров и пациентов с саркоидозом легких. Горизонтальная линия внутри прямоугольника — медиана, ● — среднее значение. * — различия значимы ($p < 0.05$) при сравнении пациентов с саркоидозом легких без терапии с условно здоровыми донорами; Δ — различия значимы ($p < 0.05$) при сравнении пациентов с саркоидозом легких без терапии и пациентами с саркоидозом легких на терапии (*U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

генотипов по полиморфизму rs1883965 гена *MTOR* в исследуемой группе больных и в группе здоровых людей ($\chi^2 = 1.01, p = 0.602$) и ($\chi^2 = 1.45, p = 0.485$) соответственно.

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий в распределении генотипов и аллелей по полиморфному варианту rs2295080 гена *MTOR* в группе больных саркоидозом легких по сравнению с контрольной группой ($p > 0.05$). Также не установлено отличий в распределении генотипов и аллелей по полиморфному маркеру rs1883965 гена *MTOR* между исследуемыми группами ($p > 0.05$) (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы, повышенная экспрессия mTOR была связана с онкогенезом, а именно с пролиферацией и выживаемостью опухолевых клеток [19]. В работе С. Rubie и соавт. показано значимое повышение ($p = 0.0001$) уровня экспрессии гена *MTOR* в ЛПК больных диабетом 2-го типа [20]. По результатам наших исследований в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом легких значимо повышен уровень транскриптов гена *MTOR* ($p = 0.007$). Отмечено снижение уровня экспрессии мРНК гена *MTOR* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) больных на фоне проводимой терапии ($p = 0.025$). Возможно повышенный уровень транскриптов этого гена в ЛПК связан с развитием воспаления при саркоидозе легких. Как

Таблица 1. Распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе

Полиморфизм	Показатель		Больные саркоидозом легких (<i>n</i> = 122)	Контрольная группа (<i>n</i> = 131)	χ^2
rs2295080	Аллели	<i>T</i>	149 (0.611)	165 (0.630)	0.196 (d.f. = 1, <i>p</i> = 0.658)
		<i>G</i>	95 (0.389)	97 (0.370)	
	Генотипы	<i>TT</i>	44 (0.361)	48 (0.366)	0.637 (d.f. = 2, <i>p</i> = 0.728)
		<i>TG</i>	61 (0.5)	69 (0.527)	
		<i>GG</i>	17 (0.139)	14 (0.107)	
rs1883965	Аллели	<i>G</i>	163 (0.668)	173 (0.660)	0.034 (d.f. = 1, <i>p</i> = 0.855)
		<i>A</i>	81 (0.332)	89 (0.340)	
	Генотипы	<i>GG</i>	52 (0.426)	54 (0.412)	0.051 (d.f. = 2, <i>p</i> = 0.975)
		<i>GA</i>	59 (0.484)	65 (0.496)	
		<i>AA</i>	11 (0.090)	12 (0.092)	

Примечание. *n* – число обследованных лиц. Данные представлены в виде абсолютных значений, в скобках – относительные частоты.

указано выше, *MTOR* является ключевым участником сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, который регулирует аутофагию, апоптоз, ключевые гомеостатические процессы, способствующие разрешению воспаления [21].

Как отмечено ранее, однонуклеотидные замены в гене *MTOR* ассоциированы с риском развития различных патологий и оказывают влияние на транскрипционную активность гена, связывание или сплайсинг микроРНК [22]. К мутациям, которые связаны с изменением экспрессии гена *MTOR* относятся полиморфные маркеры rs2295080 и rs1883965. Так, уровень экспрессии гена *MTOR* выше у носителей генотипа *TT* по rs2295080 (промотор гена) [23, 24]. В исследовании М. Saravani и соавт. показана связь указанного полиморфного локуса с риском развития системной красной волчанки. По результатам регрессионного анализа риск развития данного заболевания повышен в 2.6 раза у носителей генотипа *TT* по указанному полиморфному варианту гена *MTOR* [23, 24]. По данным метаанализа, основанного на пяти исследованиях, у носителей *TT* по полиморфному маркеру rs2295080 гена *MTOR* повышен риск развития онкологических заболеваний с благоприятным исходом [25]. По данным другого метаанализа, включавшего девять исследований, показано, что носительство генотипа *TG* полиморфного локуса rs2295080 гена *MTOR* связано с повышенным риском развития лейкемии и сниженным риском рака мочеполовой системы [26]. Показано также, что полиморфный вариант rs2295080 гена *MTOR* вовлечен в патогенез туберкулеза [27].

Саркоидоз, как и туберкулез, относятся к granulomatозным воспалительным заболеваниям и составляют вместе около 5% всей легочной патологии [28]. В настоящем исследовании мы изучили

вклад полиморфного маркера rs2295080, а также rs1883965 гена *MTOR* в развитие и прогрессирование саркоидоза легких. Согласно полученным данным настоящего исследования, не выявлена связь этих полиморфных вариантов гена *MTOR* с саркоидозом легких. Отсутствие ассоциации полиморфного варианта rs1883965 с туберкулезом показано в работе М. Wang и соавт. [27]. Мутация rs1883965 A>C расположена в первом интроне гена *MTOR*. Эта однонуклеотидная замена оказывает влияние на связывание с транскрипционным фактором и на уровень экспрессии гена [14, 26]. Что касается полиморфного локуса rs2295080, то по данным литературы, этот аллельный полиморфизм влияет на уровень экспрессии гена *MTOR* в зависимости от носительства аллельных вариантов данного гена. Уровень экспрессии выше у носителей аллеля *T* и генотипа *TT* [29].

Таким образом, по результатам настоящего исследования не установлена ассоциация исследуемых полиморфных маркеров rs2295080 и rs1883965 гена *MTOR* с развитием саркоидоза легких. В то же время в лейкоцитах периферической крови больных со стабильным течением заболевания (без рецидивов) повышена экспрессия мРНК гена *MTOR*, что может свидетельствовать о вовлеченности этого гена в патогенез саркоидоза легких. Сведения о связи аллельных вариаций генов с восприимчивостью людей к саркоидозу легких, а также вклад полиморфных вариантов генов в патогенез данного заболевания, будут иметь большое значение в поиске потенциальных внутриклеточных мишеней для противовоспалительной терапии.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карель-

ского научного центра Российской академии наук (тема FMEN-2022-0009).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го 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.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarbasov D.D., Ali S.M., Kim D.H. et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
2. *Huang S.* mTOR signaling in metabolism and cancer // *Cells.* 2020. V. 9. № 10. <https://doi.org/10.3390/cells9102278>
3. *Linke M., Pham H.T., Katholnig K. et al.* Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression // *Nat. Immunol.* 2017. V. 18. № 3. P. 293–302. <https://doi.org/10.1038/ni.3655>
4. *Шмелёв Е.И.* Саркоидоз // *Атмосфера, пульмонология и аллергология.* 2004. № 2. С. 3–10.
5. *Малышева И.Е., Тихонович Э.Л., Олейник Е.К. и др.* Поляризация макрофагов при саркоидозе // *Мед. иммунология.* 2021. Т. 23. № 1. P. 7–16. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-MPI-2083>
6. *Пархитко А.А., Фаворова О.О., Хабибуллин Д.И. и др.* Киназа амTOR: регуляция, роль в поддержании клеточного гомеостаза, развитии опухолей и старении // *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 2. С. 128–143.
7. *Jhanwar-Uniyal M., Amin A.G., Cooper J.B.* Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects // *Adv. Biol. Regul.* 2017. V. 64. P. 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.12.001>
8. *Locke L., Schlesinger L., Crouser E.* Current sarcoidosis models and the importance of focusing on the granuloma // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01719>
9. *Pouché L., Stojanova J., Pierre Marquet P., Picard N.* New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: The genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs // *Pharmacogenomics.* 2016. V. 17. № 3. P. 277–296. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.169>
10. *Xu M., Gao Y., Yu T.* Functional promoter rs2295080 T>G variant in *MTOR* gene is associated with risk of colorectal cancer in a Chinese population // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2015. V. 70. P. 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.045>
11. *Lan J., Zhu Y., Rao J. et al.* *MTOR* gene polymorphism may be associated with microscopic polyangiitis susceptibility in a Guangxi population of China // *Gene.* 2023. V. 854. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147101>
12. *Min Z., Mi Y., Lv Z. et al.* Associations of Genetic Polymorphisms of mTOR rs2295080 T/G and rs1883965 G/A with Susceptibility of Urinary System Cancers // *Dis. Markers.* 2022. V. 17. <https://doi.org/10.1155/2022/1720851>
13. *Paterno J., Koskela A., Hyttinen J.* Autophagy genes for wet age-related macular degeneration in a finnish case-control study // *Genes.* 2020. V. 11. P. 1318. <https://doi.org/10.3390/genes11111318>
14. *Li H., Liu Y., Huang J. et al.* Association of genetic variants in lncRNA GAS5/miR-21/mTOR axis with risk and prognosis of coronary artery disease among a Chinese population // *J. Clin. Lab. Anal.* 2020. V. 34. № 10. <https://doi.org/10.1002/jcla.23430>
15. *Baughman R.P., Culver D.A., Judson M.A.* A concise review of pulmonary sarcoidosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 183. № 5. P. 573–581. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0865CI>
16. *Bizhani F., Hashemi M., Danesh H. et al.* Association between single nucleotide polymorphisms in the PI3K/AKT/mTOR pathway and bladder cancer risk in a sample of Iranian population // *EXCLI J.* 2018. V. 17. P. 3–13. <https://doi.org/10.17179/excli2017-329>
17. Клинические рекомендации по саркоидозу Минздрава России. М., 2022. С. 30–31.
18. *Pinto J., Dias V., Zoller H. et al.* Hepcidin messenger RNA xpression in human lymphocytes // *Immunology.* 2010. V. 130. № 2. P. 217–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x>
19. *Корнилов Д.О., Тряпицын М.А., Гребнев Д.Ю.* *MTOR*: сигнализация, регуляция, влияние на метаболизм, роль в регуляции продолжительности жизни и опухолевого роста // *Изв. Коми научного центра УрО РАН.* 2021. № 5. С. 104–115. <https://doi.org/10.19110/1994-5655-2021-5-104-115>
20. *Rubie C., Zimmer J., Lammert F.* MicroRNA-496 and mechanistic target of rapamycin expression are associated with type 2 diabetes mellitus and obesity in elderly people // *Ann. Nutr. Metab.* 2019. V. 74. № 4. P. 279–286. <https://doi.org/10.1159/000499576>
21. *Rahtes A., Geng S., Lee C., Li L.* Cellular and molecular mechanisms involved in the resolution of innate leukocyte inflammation // *J. Leukoc. Biol.* 2018. V. 104. № 3. P. 535–541. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0218-070R>
22. *Li Y., Zhao P., Yue X. et al.* Association of *mTOR* polymorphisms with cancer risk and clinical outcomes: a meta-analysis // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097085>
23. *Cao Q., Ju X., Li P.* A functional variant in the *MTOR* promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050302>
24. *Saravani M., Shahraki-Ghadimi H., Maruei-Milan R. et al.* Effects of the *mTOR* and *AKT* genes polymorphisms on

- systemic lupus erythematosus risk // *Mol. Biol. Rep.* 2020. V. 47. № 5. P. 3551–3556.
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05446-y>
25. Shao J., Li Y., Zhao P. et al. Association of *mTOR* polymorphisms with cancer risk and clinical outcomes: A meta-analysis // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097085>
26. Zining J., Lu X., Caiyun H., Yuan Y. Genetic polymorphisms of *mTOR* and cancer risk: A systematic review and updated meta-analysis // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 35. P. 57464–57480.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10805>
27. Wang M., Ma S.J., Wu X.Y. et al. Impact of *mTOR* gene polymorphisms and gene-tea interaction on susceptibility to tuberculosis // *J. Clin. Cases*. 2020. V. 8. № 19. P. 4320–4330.
<https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i19.4320>
28. Николаев А.В., Утехин В.И., Чурилов Л.П. Сравнительная этио-эпидемиологическая характеристика туберкулеза и саркоидоза легких: классические и новые представления // *Педиатрия*. 2020. Т. 11. № 5. С. 37–50.
<https://doi.org/10.17816/PED11537-50>
29. He J., Wang M., Qiu L. et al. Genetic variations of *mTORC1* genes and risk of gastric cancer in an Eastern Chinese population // *Mol. Carcinog.* 2013. V. 52. Suppl. 1. P. E70-9.
<https://doi.org/10.1002/mc.22013>

Study of the Association of Polymorphic Variants rs2295080 and rs1883965 of the *MTOR* Gene with the Development of Pulmonary Sarcoidosis

I. E. Malysheva^{a,*}, L. V. Topchieva^a, and E. L. Tikhonovich^b

^a*Institute of Biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia*

^b*Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, 185019 Russia*

*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

The aim of the study was to study the association of polymorphic variants rs2295080 and rs1883965 of the *MTOR* gene with the risk of developing pulmonary sarcoidosis. The study included 253 people (122 patients diagnosed with morphologically verified sarcoidosis with lung involvement (average age – 41.00 ± 12.56 years) and 131 healthy people (control group) (average age – 44.00 ± 14.23). The distribution of alleles and genotypes of polymorphic markers rs2295080 and rs1883965 of the *MTOR* gene was analyzed in the study groups. There was a statistically significant increase in the level of mRNA expression of the *MTOR* gene in PBL of patients with pulmonary sarcoidosis compared with the control group ($p = 0.007$). A decrease in the number of transcripts of this gene was noted in patients receiving therapy compared with patients without therapy ($p = 0.025$). There were no statistically significant differences in the distribution of allele and genotype frequencies for polymorphic markers rs2295080 and rs1883965 of the *MTOR* gene in the group of patients with pulmonary sarcoidosis and in the control group: ($\chi^2 = 0.196$, d.f. = 1, $p = 0.658$ and $\chi^2 = 0.637$, d.f. = 2, $p = 0.728$) and ($\chi^2 = 0.034$, d.f. = 1, $p = 0.855$ and $\chi^2 = 0.051$, d.f. = 2, $p = 0.975$) respectively. Conclusion: an increased level of expression of the *MTOR* gene in peripheral blood leukocytes of patients with pulmonary sarcoidosis may indicate the involvement of this gene in the pathogenesis of this disease. Polymorphic markers rs2295080 and rs1883965 of the *MTOR* gene are not associated with the risk of developing pulmonary sarcoidosis. Probably, an increase in the expression level of the *MTOR* gene in patients with pulmonary sarcoidosis is due to the development of inflammation.

Keywords: *Homo sapiens*, lung sarcoidosis, PCR-RFLP analysis, *MTOR* gene, allelic polymorphism, expression.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ микроРНК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. М. А. Янишевская^{1, *}, Е. А. Блинова^{1, 2}, А. В. Аклеев^{1, 2}

¹Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, 454141 Россия

²Челябинский государственный университет, Челябинск, 454001 Россия

*e-mail: yanishevskaya@urcrm.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Проведена оценка относительной экспрессии зрелых микроРНК в клетках периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в малых дозах в отдаленном периоде. В исследование были включены люди, подвергшиеся облучению в 1950-х гг. на р. Тече (Южный Урал, Россия). Кумулятивные дозы облучения красного костного мозга (ККМ) лиц из основной исследуемой группы (33 человека) находились в диапазоне от 77.7 до 2869.8 мГр (среднее значение – 698.5 мГр). Группу сравнения составили 30 человек, с дозой облучения ККМ, не превышающей 70 мГр за весь период жизни. Обратную транскрипцию образцов РНК проводили с использованием специфических шпилькообразных праймеров (“stem-loop”). Изменение относительного содержания микроРНК оценивали методом ПЦР “в реальном времени” на приборе CFX96 (“BioRad”, США). Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. У облученных людей спустя 60 лет обнаружено статистически значимое зависимое от дозы облучения ККМ увеличение содержания микроРНК hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, hsa-miR-16.

Ключевые слова: микроРНК, экспрессия, ПЦР, Южный Урал, хроническое облучение, радиационное воздействие.

DOI: 10.31857/S0016675823100156, **EDN:** ZWDVWN

Многочисленные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что существенную роль в регуляции широкого спектра клеточных функций в нормальных клетках, таких как клеточный метаболизм, пролиферация, дифференцировка, передача сигналов и апоптоз играют различные микроРНК [1].

В отличие от других известных эпигенетических механизмов регуляции биологических процессов в клетке, таких как метилирование CpG-островков промоторных районов генов, модификации гистонов, АТФ-зависимое ремоделирование хроматина, микроРНК контролируют экспрессию множества генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, активируя или, зачастую, ингибируя продукцию конкретных белков, принимающих непосредственное участие в защите клетки от неблагоприятных внешнесредовых этиологических факторов [2].

Регулируя большинство клеточных функций, микроРНК вовлечены в патогенез широкого спектра заболеваний. Так, специфические изменения профиля экспрессии различных микроРНК были установлены при многих злокачественных новообразованиях [3–6]. Аберрантная экспрессия

микроРНК наблюдается также при других патологических состояниях, включая заболевания сердечно-сосудистой системы, печени и почек [7–9].

Согласно современным данным литературы, профиль экспрессии микроРНК может быть значительно изменен после радиационного воздействия как в сторону понижения, так и в сторону повышения, в зависимости от типа клеток [10], дозы, времени после облучения [11] и характера радиационного воздействия (острое или хроническое [12]). Снижение экспрессии микроРНК было установлено уже через 30 мин после радиационного воздействия в дозе 1 Гр в нормальных фибробластах человека [13]. Измененный профиль экспрессии микроРНК после облучения также был зарегистрирован в иммортализованных клеточных линиях [14, 15] и клетках периферической крови [16, 17].

Последние исследования демонстрируют более 150 потенциальных микроРНК, чувствительных к действию радиации [18–20]. Имеются данные, которые предполагают использовать микроРНК в качестве критерия для оценки радиационного воздей-

Таблица 1. Характеристика исследуемых лиц

Характеристика групп		Основная группа N = 33	Группа сравнения N = 30
Возраст на момент обследования, лет: M ± SE (min–max)		78.0 ± 1.1 (69.0–93.0)	70.7 ± 1.6 (62.0–88.0)
Пол, N (%)	мужчины	10 (30.3)	13 (43.3)
	женщины	23 (69.7)	17 (56.7)
Этническая принадлежность, N (%)	славяне	16 (48.5)	18 (60.0)
	тюрки	17 (51.5)	12 (40.0)
Поглощенные дозы облучения ККМ, мГр M ± SE (min–max)		698.5 ± 103.3 (77.7–2869.8)	19.5 ± 3.1 (2.1–56.1)

Примечание. M ± SE (min–max) – среднее ± ошибка среднего (минимальное–максимальное значения).

ствия [21, 22]. Кроме того, исследования уровня экспрессии микроРНК являются перспективным диагностическим методом для оценки реакции клеток на лучевую терапию [22].

Важно отметить, что преобладающее количество исследований как отечественных, так и зарубежных авторов, сосредоточены на оценке динамики изменения профиля экспрессии микроРНК в ответ на острое радиационное воздействие, вызванное облучением, как правило, в высоких, клинически значимых дозах. Однако с момента активного внедрения источников ИИ в повседневную жизнь человека, несомненно актуальными становятся исследования действия малых доз. На сегодняшний день одними из наиболее значимых факторов облучения человека в развитых странах являются медицинские источники ионизирующего излучения. Бесконтрольное использование медицинских диагностических процедур приводит к дополнительным кумулятивным дозовым нагрузкам для больших групп населения, эффекты которых до сих пор изучены недостаточно.

Таким образом, на сегодняшний день открытым остается вопрос модуляции экспрессии микроРНК малыми и средними дозами ионизирующего излучения, а также кинетика изменения уровня их экспрессии в отдаленный период после радиационного воздействия.

В настоящее исследование были включены четыре микроРНК: hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p, целевыми генами которых являются гены, контролирующие контрольные точки клеточного цикла и апоптоз, для которых показана экспрессия в цельной крови/сыворотке/плазме, а также зарегистрированы изменения их экспрессии в ответ на радиационное воздействие в высоких дозах *in vitro* на клеточных культурах или в условиях облучения *in vivo* пациентов, проходящих курсы лучевой терапии рака [20, 23–25].

Цель настоящей работы – оценка относительной экспрессии зрелых микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p в клетках периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому воздействию ионизирующего излучения в малых дозах в отдаленном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследуемых лиц

Исследование экспрессии микроРНК проводилось у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на р. Тече (Южный Урал) в результате производственной деятельности ПО “Маяк” в 1950-х гг. и проживавших в одном из 40 сел, расположенных на побережье р. Течи, в период с 1950 по 1960 гг. [26]. Для всех обследованных лиц с использованием дозиметрической системы “Techa River Dosimetry System” (TRDS 2016 [27]) были рассчитаны индивидуальные поглощенные дозы облучения ККМ. В исследование не включались лица, имеющие онкологические, аутоиммунные, острые или хронические воспалительные заболевания в период обострения.

Всех обследуемых людей разделили на две группы. Основную группу составили 33 человека, в качестве группы сравнения исследованы 30 человек с поглощенной дозой облучения красного костного мозга (ККМ) не превышающей 70 мГр. Основные характеристики обследуемых лиц представлены в табл. 1.

Исследуемые группы гетерогенны по полу, возрасту и этническому составу. Как в основной группе, так и в группе сравнения в половом составе преобладают женщины. Этнический состав основной группы практически в равной степени представлен славянами и тюрками. В этническом составе группы сравнения незначительно преобладают этнические славяне.

От всех участников исследования было получено письменное информированное доброволь-

Таблица 2. Последовательности петлевых праймеров микроРНК hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, hsa-miR-21, hsa-miR-16-5p

МикроРНК	Последовательность петлевого праймера (5' → 3')	Размер, нк
hsa-miR-125b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACAA	50
hsa-miR-181a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACACC	51
hsa-miR-21-5p	GTCGTATCCAGTGCAGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACAGCCCA	56
hsa-miR-16-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA	50

ное согласие на проведение исследования, согласованное с этическим комитетом УНПЦ РМ.

США) в течение 30 мин при 16°C, 30 мин при 42°C, 5 мин при 85°C, затем охлаждали до 4°C.

Выделение РНК

Забор крови для оценки относительного содержания зрелых микроРНК, hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, hsa-miR-21, hsa-miR-16-5p проводился из локтевой вены в объеме 3 мл в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Thermo Scientific™, США). Выделение суммарной РНК осуществлялось при помощи коммерческого набора реагентов GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific™, США). Оценка количественных и качественных характеристик выделенных образцов суммарной РНК, содержащей фракцию зрелых микроРНК, проводилась при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, США). Чистоту препарата определяли по значениям поглощения на длинах волн, равных 260 и 280 нм (A260/280).

Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции суммарной РНК, содержащей фракцию зрелых микроРНК, проводили, используя коммерческий набор MMLV RT Kit (Евроген, Россия) с модификацией компонентов используемой смеси. В реакции обратной транскрипции микроРНК вместо линейных праймеров использовали специальные петлевые праймеры, последовательности которых были взяты из отечественных и зарубежных работ. Нуклеотидные последовательности данных праймеров представлены в табл. 2.

Реакционная смесь для обратной транскрипции микроРНК содержала образцы 5 мкл раствора выделенной РНК, 4 мкл 5× буфер для ОТ, 2 мкл 0.25 мМ каждого из dNTP, 2 мкл 20 мМ DTT, 1 мкл MMLV обратной транскриптазы, 2 мкл 10 мМ раствора соответствующего петлевого праймера, 2 мкл H₂O. Реакции объемом 20 мкл инкубировали в термоциклере Bio-RadC1000 (Applied Biosystems,

Полимеразная цепная реакция

Количественную ПЦР “в реальном времени” проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, в которую входило: 6 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), по 0.5 мкл прямого и обратного праймеров (F, R), 1 мкл матрицы кДНК и 17 мкл деионизированной воды. Каждый образец анализировали в двух повторах. Температурно-временной режим и характеристики праймеров для ПЦР каждой исследуемой микроРНК представлены в табл. 3. Данные были проанализированы с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [28]. В качестве гена нормализатора использовали β -actin (ACTB). Расчет проводился с помощью программного обеспечения прибора Real-Time CFX96 Touch (“BioRad”, США).

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного комплекса Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение выборок данных проводили с использованием U -критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Корреляционный анализ с целью оценки влияния дозы облучения ККМ на показатели экспрессии микроРНК проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции (R) по Спирмену. Для оценки зависимости относительной экспрессии микроРНК от дозы облучения ККМ был проведен регрессионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ данных экспрессии микроРНК

Результаты оценки относительного содержания микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-

Таблица 3. Температурно-временной режим ПЦР в реальном времени и характеристика праймеров для исследуемых микроРНК

МикроРНК	Последовательность праймера (5' → 3')	Размер, нк	Условия ПЦР-РВ
hsa-miR-125b-5p	F: GCGGCTCCCTGAGACCCTAAC	21	1. 95°C – 10 мин 2. 95°C – 15 с } 45 × 57°C – 45 с } 72°C – 25 с }
	R: GTGCAGGGTCCGAGGT	16	
hsa-miR-181a-5p	F: GCGGCAACATTCAACGCTGTC	21	1. 95°C – 10 мин 2. 95°C – 15 с } 45 × 57°C – 45 с }
	R: GTGCAGGGTCCGAGGT	16	
hsa-miR-21-5p	F: GCGGCAACACCAGTTCGATG	19	1. 95°C – 10 мин 2. 95°C – 15 с } 50 × 60°C – 45 с }
	R: TGCGTGTTCGTGGAGT	16	
hsa-miR-16-5p	F: TTCGGTAGCAGCACGTAATA	21	1. 95°C – 10 мин 2. 95°C – 15 с } 45 × 57°C – 45 с } 72°C – 20 с }

5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p в исследуемых группах представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, при сравнении двух исследуемых групп, были найдены статистически значимые различия в относительном содержании микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p и микроРНК hsa-miR-16-5p. Относительное содержание данных микроРНК в группе облученных лиц было статистически значимо выше, чем в группе сравнения. По сравнению с группой сравнения уровень экспрессии микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-16-5p и hsa-miR-181a-5p увеличен в 2.9, 3.5 и 1.5 раза соответственно. Исключение составили показатели, рассчитанные для микроРНК hsa-miR-21-5p, для которой не было получено статистически значимых различий с группой сравнения.

Методом корреляционного анализа была изучена связь между содержанием зрелых микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p и поглощенной дозой облучения ККМ. В группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, были выявлены слабые положительные корреляционные связи между относительным содержанием микроРНК hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-16-5p и hsa-miR-125b-5p и поглощенной дозой облучения ККМ ($R = 0.28$, $p = 0.03$; $R = 0.33$, $p = 0.01$ и $R = 0.28$, $p = 0.04$ соответственно).

Зависимость относительного содержания микроРНК от поглощенной дозы облучения ККМ также была исследована методом регрессионного

анализа. Результаты регрессионного анализа показали зависимость относительного содержания микроРНК от дозы, накопленной ККМ только для hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p ($R = 0.33$, $R^2 = 0.11$, $p = 0.01$ и $R = 0.27$, $R^2 = 0.08$, $p = 0.03$ соответственно). Для микроРНК hsa-miR-125b-5p подобная зависимость не выявлена ($R = 0.19$, $R^2 = 0.03$, $p = 0.16$). Зависимость относительной экспрессии исследуемых микроРНК от поглощенной дозы облучения ККМ проиллюстрирована на рис. 2. Сглаживание значений данных произведено с использованием метода скользящей средней, а данные на графиках представлены в виде средних групповых. Уравнение линии регрессии $y = a + bx$ представлено в виде прямой и рассчитано по индивидуальным показателям.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что микроРНК hsa-miR-125b, hsa-miR-181a и hsa-miR-16 могут играть важную роль в ответе на радиационное воздействие путем нацеливания на гены, белковые продукты которых принимают участие в защите клетки от облучения. Основным механизмом действия микроРНК заключается в том, что микроРНК в составе белкового комплекса с высокой специфичностью связывается с комплементарным участком в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК-мишени (целевого гена) [29]. Активность микроРНК дифференцирована – если комплементарность не абсолютная, целевая

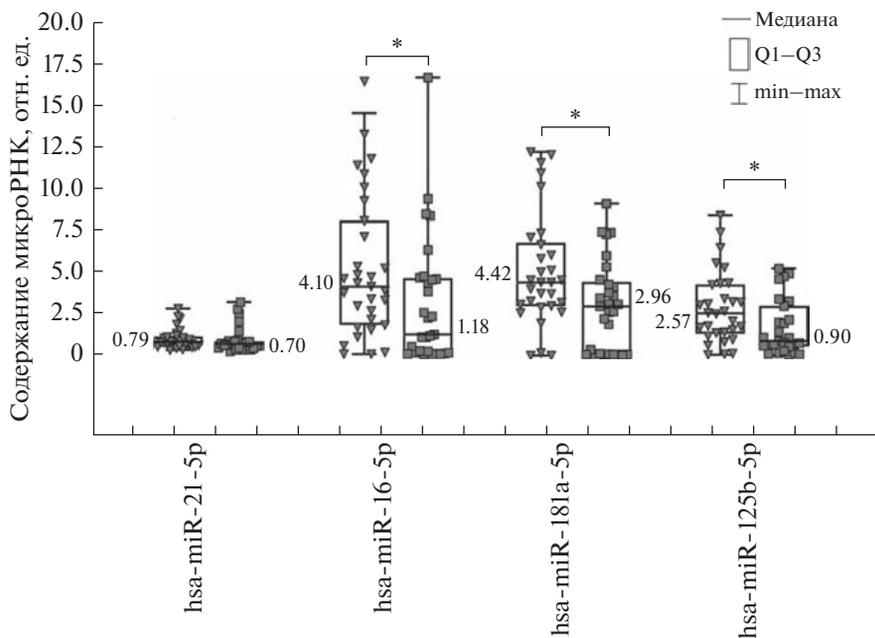


Рис. 1. Относительное содержание микроРНК hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-125b-5p (отн. ед.) в группах обследуемых лиц. ■ – облученные лица, ▼ – группа сравнения, * – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$).

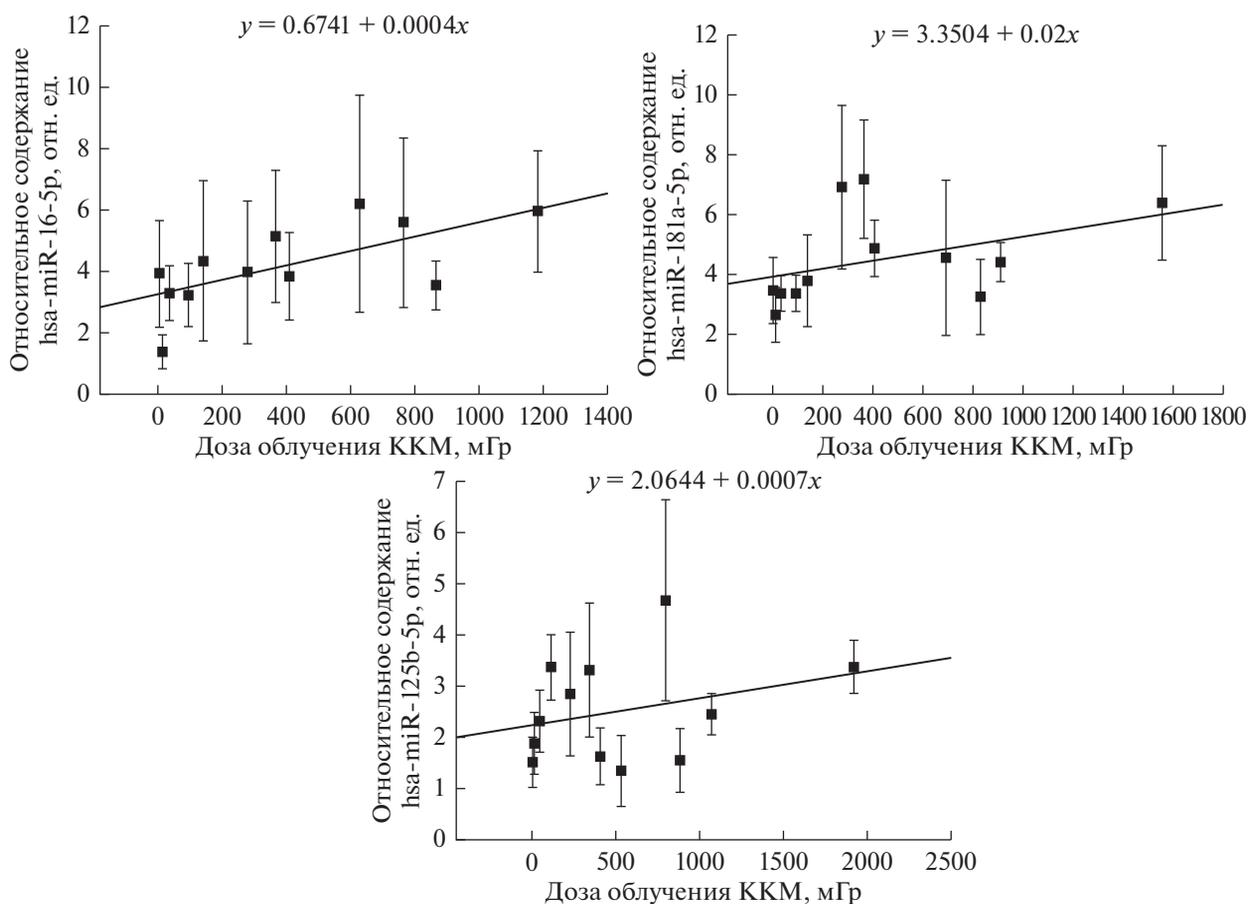


Рис. 2. Зависимость относительного содержания микроРНК hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a и hsa-miR-125b от дозы облучения ККМ.

мРНК может не деградировать, а только временно блокироваться, но при этом нарушается синтез белка. Кроме того, действие микроРНК может кардинально отличаться в зависимости от состояния клетки. При определенных клеточных состояниях, таких как остановка клеточного цикла в G0/G1, клеточный стресс или нехватка питательных веществ, микроРНК также могут индуцировать активацию трансляции [30].

Представленные в работе результаты показывают, что экспрессия микроРНК может модулироваться в клетках крови в ответ на радиационное воздействие в диапазоне малых и средних доз. В результате исследования относительного количества зрелых микроРНК в цельной крови людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, были выявлены статистически значимые различия в экспрессии ряда микроРНК. Наблюдалась повышенная экспрессия микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p в группе облученных лиц, с дозами облучения ККМ от 77.7 до 2869.8 мГр (среднее значение – 698.5 мГр). Отмечены слабые корреляционные связи микроРНК hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p с дозой облучения ККМ.

МикроРНК, исследуемые в данной работе наиболее активно изучают в контексте оценки радиорезистентности опухолей и прогнозировании ответа на лучевую терапию рака, где дозовый диапазон значительно отличается от представленного в настоящем исследовании. Так, например имеющиеся данные свидетельствуют о том, что микроРНК hsa-miR-16, регулирующая клеточный цикл, пролиферацию, апоптоз и онкогенность *in vitro* и *in vivo*, может повышать чувствительность клеток к облучению, регулируя сигнальный путь TLR1/NF-κB, и действует как потенциальный терапевтический подход для преодоления радиорезистентности при лечении рака [31]. Показано, что у пациентов, получавших лучевую терапию при плоскоклеточном раке пищевода (средняя доза облучения составила 60.2 ± 9.1 Гр при дозе 2 Гр в день, 5 дней в неделю) уровень микроРНК hsa-miR-16 плазмы крови увеличился более чем в 2 раза.

С другой стороны, для микроРНК hsa-miR-181a, hsa-miR-125b в литературе показано снижение их экспрессии в ответ на радиационное воздействие в высоких, клинически значимых дозах. Так, при облучении *in vitro* клеточной линии глиобластомы U87MG рентгеновскими лучами в дозе 18.8 Гр наблюдалось снижение экспрессии hsa-miR-181a ($p < 0.05$) [32]. Снижение экспрессии hsa-miR-125b было отмечено в работе [33] при облучении *in vitro* раковой клеточной линии предстательной железы DU-145 после однократного гамма-облучения в дозе 4 Гр.

В то же время в периферической крови пациентов, в отдаленные сроки (спустя несколько де-

сятков лет), перенесших острую лучевую болезнь (ОЛБ), получивших местные лучевые поражения (МЛП), а также ОЛБ + МЛП не обнаружено изменение в экспрессии зрелых микроРНК hsa-miR-16, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, однако у пациентов, перенесших только ОЛБ наблюдалось снижение содержания микроРНК hsa-miR-21 [34].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, демонстрирующие наоборот, активацию микроРНК hsa-miR-16, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, вероятно обусловлены особенностями радиационного воздействия (хроническое радиационное облучение в диапазоне малых и средних доз), которому подверглись жители прибрежных сел р. Течи. Следует подчеркнуть, что относительное содержание микроРНК hsa-miR-21, которая регулирует клеточную выживаемость после облучения, включая оксидативный метаболизм, задержку клеточного цикла, апоптоз и другие важнейшие клеточные процессы, у облученных лиц не отличалось от такового в группе сравнения.

Изменение экспрессии микроРНК может отражаться на транскрипционной активности генов-мишеней. В частности, для исследуемых нами микроРНК hsa-miR-16, hsa-miR-181a, hsa-miR-125b показана негативная регуляция антиапоптотического гена *BCL-2* [35]. Важно отметить, что *BCL-2* участвует в клеточном ответе на облучение, являясь центральной фигурой множества регуляторных систем клетки, таких как апоптоз, пролиферация и поддержание генетической стабильности в опухолевых клетках. Кроме того, микроРНК hsa-miR-181a может модулировать (усиливать или ингибировать) апоптотическую гибель клеток прямым взаимодействием с генами *ATM*, *K-Ras*, *BCL-2* [2].

Ранее у облученных жителей прибрежных сел р. Течи было зарегистрировано снижение уровня мРНК гена *BCL-2* [36]. Можно предположить, что наблюдаемый эффект обусловлен взаимодействием исследуемых нами микроРНК с мРНК-мишенью *BCL-2* в 3'-UTR области, с последующим ее деаденированием и декапированием, результатом чего может являться деградация транскрипта и, как следствие, регистрируемое снижение количества мРНК [29, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отдаленные сроки (спустя 60 лет после начала облучения) в широком диапазоне доз 77.7–2869.8 (698.5 ± 103.3) облучения ККМ у жителей прибрежных сел р. Течи зарегистрировано повышение экспрессии микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p.

Результаты исследования позволяют предположить возможное участие микроРНК в модуляции таких клеточных процессов как клеточный

цикл, апоптоз и пролиферация в период реализации отдаленных канцерогенных и неканцерогенных эффектов у жителей прибрежных сел р. Течи. Однако для уточнения и подтверждения результатов, полученных в настоящей работе, необходимо увеличить объем выборки исследуемых лиц.

Финансирование работы осуществлялось в рамках федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го 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.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B. et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 1. P. 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
2. *Mao A., Liu Y., Zhang H. et al.* microRNA expression and biogenesis in cellular response to ionizing radiation // *DNA and Cell Biology.* 2014. V. 33. № 10. P. 667–679. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2401>
3. *Pashaei E., Pashaei E., Ahmady M. et al.* Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179543>
4. *Adhami M., Haghdoust A.A., Sadeghi B. et al.* Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: A systematic review // *Breast Cancer.* 2018. V. 25. № 2. P. 198–205. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0814-803>
5. *Pardini B., De Maria D., Francavilla A. et al.* MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. № 1. P. 696. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4590-4>
6. *Shao C., Yang F., Qin Z. et al.* The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: A systematic review with meta-analysis // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 1. P. 1103. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6297-6>
7. *Ромакина В.В., Жиров И.В., Насонова С.Н. и др.* МикроРНК как биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний // *Кардиология.* 2018. Т. 58. № 1. С. 66–71. <https://doi.org/10.18087/cardio.2018.1.10083>
8. *Otsuka M., Kishikawa T., Yoshikawa T. et al.* MicroRNAs and liver disease // *J. Hum. Genet.* 2016. V. 62. P. 75–80. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.53>
9. *Zhang Y., Jia Y., Zheng R. et al.* Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. № 12. P. 1830–1838. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147850>
10. *Metheetrait C., Slack F.J.* MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy // *Curr. Op. in Genet. & Development.* 2013. V. 23. № 1. P. 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.01.002>
11. *Jacob N.K., Cooley J.V., Yee T.N. et al.* Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation biodosimetry // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057603>
12. *Chaudhry M.A., Omaruddin R.A., Kreger B. et al.* MicroRNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation // *Mol. Biol. Reports.* 2012. V. 39. № 7. P. 7549–7558. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1589-9>
13. *Simone N.L., Soule B.P., Ly D. et al.* Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression // *PLoS One.* 2009. V. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006377>
14. *Shin S., Cha H.J., Lee E.M. et al.* Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells // *Int. J. Oncol.* 2009. V. 35. № 1. P. 81–86.
15. *Chaudhry M.A.* Real-time PCR analysis of microRNA expression in ionizing radiation-treated cells // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2009. V. 24. № 1. P. 49–56. <https://doi.org/10.1089/cbr.2008.0513>
16. *Song M., Xie D., Gao S. et al.* A biomarker panel of radiation-upregulated miRNA as signature for ionizing radiation exposure // *Life (Basel).* 2020. V. 10. № 12. P. 361. <https://doi.org/10.3390/life10120361>
17. *Templin T., Paul S., Amundson S.A. et al.* Radiation-induced microRNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients // *Int. J. of Rad. Oncol., Biol., Physics.* 2011. V. 80. № 2. P. 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.061>
18. *Weidhaas I., Babar S.M., Nallur P. et al.* MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 23. P. 11111–11116.
19. *Maes O.C., An J., Sarojini H. et al.* Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation // *J. Cell Biochem.* 2008. V. 105. № 3. P. 824–834. <https://doi.org/10.1002/jcb.21878>
20. *Templin T., Paul S., Amundson S.A. et al.* Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients // *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 2011. V. 80. № 2. P. 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.061>
21. *Lacombe J., Sima C., Amundson S.A., Zenhausern F.* Candidate gene biodosimetry markers of exposure to external ionizing radiation in human blood: A systematic review // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198851>
22. *Jacob N.K., Cooley J.V., Yee T.N. et al.* Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation

- biodosimetry // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057603>
23. Chen G., Zhu W., Shi D. et al. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting *Bcl-2* // *Oncol. Reports*. 2010. V. 23. № 4. P. 997–1003. https://doi.org/10.3892/or_00000725
 24. Beer L., Seemann R., Ristl R. et al. High dose ionizing radiation regulates micro RNA and gene expression changes in human peripheral blood mononuclear cells // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 814. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-814>
 25. Sun Y., Hawkins P.G., Bi N. et al. Serum microRNA signature predicts response to high-dose radiation therapy in locally advanced non-small cell lung cancer // *Int. J. of Rad. Oncol., Biol., Physics*. 2018. V. 100. № 1. P. 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.08.039>
 26. Силкин С.С., Крестинина Л.Ю., Старцев В.Н. и др. Уральская когорта аварийно-облученного населения // *Медицина экстрем. ситуаций*. 2019. Т. 21. № 3. С. 393–402.
 27. Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I. et al. Enhancements in the Techa River dosimetry system: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures // *Health Physics*. 2019. V. 117. № 4. P. 378–387. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001067>
 28. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 29. Riolo G., Cantara S., Marzocchi C., Ricci C. miRNA targets: From prediction tools to experimental validation // *Meth. and Protocols*. 2020. V. 4. № 1. <https://doi.org/10.3390/mps4010001>
 30. Stroynowska-Czerwinska A., Fiszer A., Krzyzosiak W.J. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells // *Cell. and Mol. Life Sci*. 2014. V. 71. № 12. P. 2253–2270. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1551-6>
 31. Aqeilan R.I., Calin G.A., Croce C.M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives // *Cell Death Differ*. 2010. V. 17. № 2. P. 215–220. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.69>
 32. Chen G., Zhu W., Shi D. et al. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting *Bcl-2* // *Oncol. Reports*. 2010. V. 23. № 4. P. 997–1003. https://doi.org/10.3892/or_00000725
 33. Махоткин М.А., Чеботарев Д.А., Тютякина М.Г. и др. Роль микроРНК в развитии радиорезистентности клеток рака предстательной железы (экспериментальное исследование) // *Онкоурология*. 2021. Т. 17. № 4. С. 85–93. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2021-17-4-85-93>
 34. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М. и др. Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2019. № 1. С. 103–109.
 35. Yang D., Zhan M., Chen T. et al. miR-125b-5p enhances chemotherapy sensitivity to cisplatin by down-regulating *Bcl2* in gallbladder cancer // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. <https://doi.org/10.1038/srep43109>
 36. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту ТСР-мутантных лимфоцитов // *Радиация и риск (Бюлл. Нац. рад.-эпидем. регистра)*. 2020. Т. 29. № 2. С. 89–100.

Effect of Chronic Radiation Exposure on Human microRNA Expression

M. A. Yanishevskaya^{a, *}, E. A. Blinova^{a, b}, and A. V. Akleyev^{a, b}

^aUrals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, 454141 Russia

^bChelyabinsk State University, Chelyabinsk, 454001 Russia

*e-mail: yanishevskaya@urcrm.ru

Relative expression of mature microRNA assessed in peripheral blood cells in persons chronically exposed to low-dose radiation in the long-term period. The study included people exposed in the 1950s on the Techa River (Southern Urals, Russia). The cumulative red bone marrow doses (RBM) of the persons in the main study group (33 persons) ranged from 77.7 to 2869.8 mGy (mean value – 698.5 mGy). The comparison group consisted of 30 people with RBM dose not exceeding 70 mGy over their lifetime. Reverse transcription of RNA samples was performed using specific stem-loop primers (“stem-loop”). Changes in the relative content of microRNA were assessed by real-time PCR on the CFX96 detection system (BioRad, USA). Statistical analysis of the results was performed using Mann–Whitney U-criterion. A significant increase in hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, and hsa-miR-16-5p content was detected in exposed people after 60 years, and their expression was found to depend on the RBM dose.

Keywords: microRNA, expression, PCR, the Techa River, chronic exposure, radiation exposure.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ АССОЦИАТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИИ С ПОЛИМОРФНЫМИ ЛОКУСАМИ, ЛОКАЛИЗОВАННЫМИ В ХРОМОСОМНЫХ ОБЛАСТЯХ 4p15.2 И 20q13.31

© 2023 г. А. Э. Гареева^{1, 2, *}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа, 450008 Россия

*e-mail: annagareeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

На протяжении пятнадцати лет полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) позволили выявить несколько миллионов полиморфных маркеров риска развития шизофрении, значительно продвинув наше понимание генетической архитектуры шизофрении. Целью настоящего исследования явилось изучение генетических факторов риска развития шизофрении при проведении полногеномного анализа ассоциации у русских, татар и башкир из Республики Башкортостан. Исследованная выборка состояла из 816 больных параноидной шизофренией и 989 здоровых индивидов. Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе PsychChip, включавшим 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНП). В результате проведенного исследования впервые установлена ассоциация ОНП rs73254185 (4p15.2) и rs587778384 гена *GNAS* (20q13.31) с риском развития параноидной шизофрении у индивидов различной этнической принадлежности, русских, татар и башкир, проживающих в Республике Башкортостан, что вероятно может свидетельствовать о вовлеченности, локализованных в данных хромосомных областях генов *P14K2B* и *GNAS* в патогенез шизофрении.

Ключевые слова: генетика, шизофрения, полногеномный анализ ассоциаций, этническая принадлежность, Республика Башкортостан, международный консорциум по психиатрической генетике.

DOI: 10.31857/S0016675823100053, EDN: UEZTIU

Шизофрения представляет собой сложное и часто хроническое психическое расстройство с высокой наследственностью. Диагноз шизофрении по-прежнему ставится клинически на основании психиатрических симптомов; на сегодня нет доступных диагностических тестов или биомаркеров. Схема диагностики и лечения, основанная на патофизиологии, также недоступна. Выяснение патогенеза необходимо для разработки подходов диагностики и лечения.

За последние несколько десятилетий генетические исследования значительно продвинули наше понимание генетической архитектуры шизофрении. Крупномасштабные генетические исследования показали, что как редкие, так и распространенные генетические варианты играют важную роль в развитии этого заболевания [1, 2].

Целый ряд GWAS-исследований были проведены в разных этнических группах: индийцев [3], афро-американцев [4], латино-американцев [5] и

японцев [6]. Тем не менее, большинство крупномасштабных GWAS-исследований шизофрении были проведены в выборках европейского происхождения. Установленные в одной популяции результаты не всегда воспроизводятся в других, что и является одной из основных проблем при проведении GWAS. Причинами данного явления может, во-первых, являться недостаточная статистическая мощность репликативной выборки. Другая причина – разные частоты аллелей и структура неравновесного сцепления в популяциях. В ходе проведенного GWAS-исследования в 2019 г. на выборке восточноазиатского происхождения была установлена ассоциация трех хромосомных регионов, которая также была обнаружена и у европейцев. Однако ассоциация других 14 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНП) с шизофренией была выявлена только у китайцев [7]. Эти данные указывают на существование как общих, так и эт-

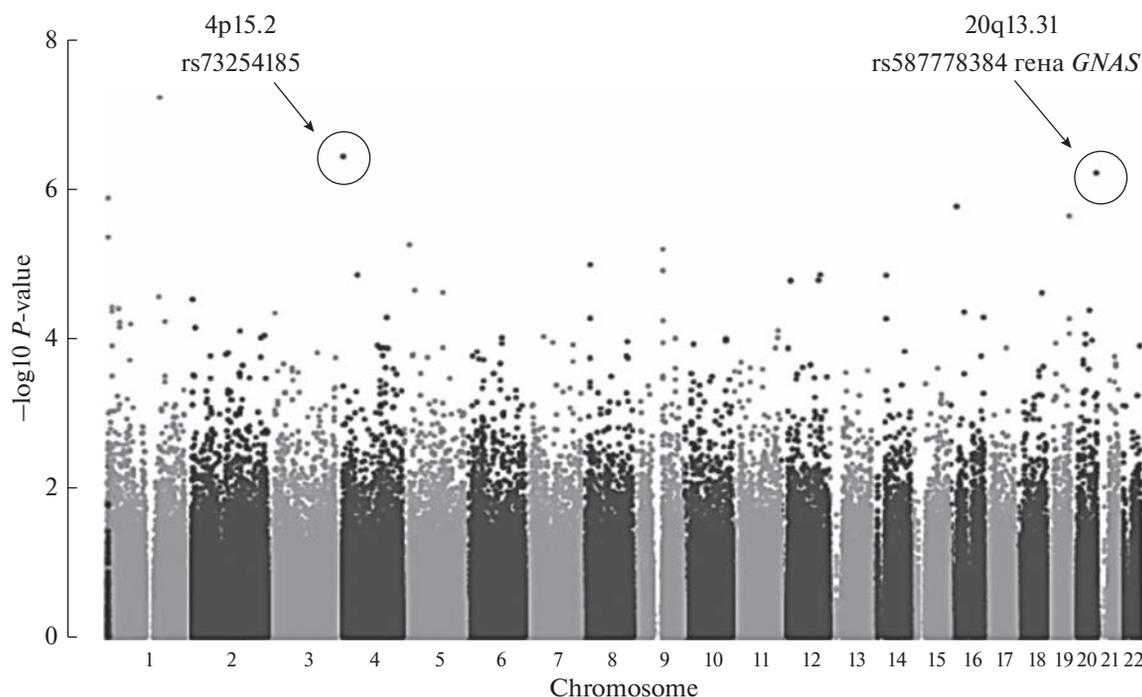


Рис. 1. Графическое изображение результатов полногеномного анализа ассоциации 395832 ОНП с параноидной шизофренией (Manhattan plot). На оси *X* указана хромосомная локализация ОНП; на оси *Y* – значения отрицательного десятичного логарифма уровня значимости *P*-value.

но-специфических маркеров риска развития шизофрении.

Цель настоящего исследования – изучение генетических факторов риска развития шизофрении при проведении полногеномного анализа ассоциации в Республике Башкортостан (рис. 1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – 437 мужчин, 379 женщин из них (320 русских, 357 татар, 139 башкир) с диагнозом параноидная шизофрения (ПШ) – F20.xx – согласно международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10). Больные находились на лечении в Республиканской клинической психиатрической больнице № 1 Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. Средний возраст больных составил 24.9 ± 8.9 лет. Средний возраст начала заболевания составил 22.4 ± 7.3 лет. Информацию по этнической принадлежности до третьего поколения получали путем опроса. Контрольная группа состояла из 402 русских, 383 татар, 204 башкир той же возрастной группы, не состоявшие на учете у психиатра и нарколога и отрицавшие у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям. Средний возраст здоровых доноров составил 32.4 ± 12.4 года.

Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе Illumina Human

610-Quad PsychChip, включающим 610000 ОНП, в Институте Брода при Гарвардском университете в рамках Международного консорциума по психиатрической генетике. Полногеномный анализ ассоциации однонуклеотидных полиморфных локусов выполнен с помощью пакета программ PLINK 2.0 [8].

Проверка качества образцов ДНК и прогенотипированных ОНП подразумевала исключение из дальнейшего анализа образцов ДНК с выявленным несоответствием между обозначенным и установленным при генотипировании полом, а также образцов ДНК, в которых более чем у 2% маркеров не прошло генотипирование. Дублированные образцы ДНК и образцы ДНК возможных близких родственников были выявлены и исключены на основе анализа доли идентичных аллелей у различных индивидов, а также доли аллелей с вероятным общим происхождением. Были исключены ОНП, по которым не прошли генотипирование более чем у 5% индивидов, ОНП с частотой редкого аллеля менее 0.01 и ОНП со статистически значимым отклонением ($p = 1.0E-06$) от равновесия Харди–Вайнберга. В результате проведения всех этапов контроля качества и корректировки генетической стратификации 395832 однонуклеотидных полиморфных вариантов были включены в дальнейших анализ. Полногеномный уровень значимости для данного исследования составил $p = 1.26E-07$. Для снижения ошибки первого рода

Таблица 1. Однонуклеотидные полиморфные варианты, локализованные в области 4p15.2 и ассоциированные с параноидной шизофренией

Ген	№ rs	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1		Аллель 2	p	P _{fidr}	OR
				больные, %	контроль, %				
<i>LOC105374536</i>	rs73254185	g.25458395G>A	A	0.00618	0.03309	G	3.70E-07	0.012	0.174
<i>LOC105374536</i>	rs6852016	g.25440525G>A	A	0.2974	0.3459	G	1.76E-03	0.856	0.794
–	rs12502737	g.25066802A>C	C	0.4541	0.498	A	3.59E-03	0.884	0.821
<i>LOC105374536</i>	rs10008104	g.25444762G>A	A	0.2907	0.3348	G	4.41E-03	0.891	0.811
–	rs7654693	g.25066309T>G	G	0.2699	0.3046	T	0.018	0.957	0.838
–	rs759245	g.25058232A>G	G	0.4137	0.3802	A	0.038	0.991	1.154

была применена поправка FDR-BH (False Discovery Rate Benjamini-Hochberg) на число множественных сравнений [9].

Выборки больных и контроля в данной работе являются генетически гетерогенными, поскольку в нее входят представители различных этнических групп (русских, татар и башкир), которые сформировались на основе различных популяций западно-евразийского и восточно-евразийского происхождения. Нами была применена поправка на этническую гетерогенность групп больных и контроля методом EIGENSTRAT [10], так как смешанное происхождение выборки, отличия по частотам аллелей полиморфных маркеров между этническими группами и различная представленность индивидов из разных этносов в выборках больных и контроля могут привести к случайной ассоциации маркеров с заболеванием. В основе данного метода лежит вычисление главных компонент генетической изменчивости в исследуемых выборках. Установив оси генетической изменчивости выборки, обусловленные популяционной структурой, но не связанные с заболеванием, метод позволяет для каждого маркера оценить его вес в определении той или иной оси и провести тем самым индивидуальную поправку для каждого кандидатного маркера. Это минимизирует появление ложноположительных ассоциаций и одновременно увеличивает вероятность определения достоверных ассоциаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ассоциации параноидной шизофрении с полиморфными локусами, локализованными в области 4p15.2

В настоящем полногеномном анализе был выявлен ряд полиморфных локусов, ассоциированных с ПШ с уровнем значимости порядка $p = 3.70E-07$, которые с большой долей вероятности могут участвовать в формировании наследственной предрасположенности к параноидной шизофрении (рис. 1, табл. 1). Данные локусы локализованы в об-

ласти 4p15.2. Один из них – rs73254185, локализован на коротком плече хромосомы 4 в интронной области гена, кодирующего РНК (*LOC105374536*), функция которого пока не известна.

По данным проекта “1000 геномов” частота встречаемости аллеля *rs73254185*A* в популяциях мира варьирует. Так, аллель *rs73254185*A* реже всего встречается в популяциях европейского происхождения (CEU 1.5%), в африканских популяциях его частота выше (AFR 4.5%), но чаще всего аллель встречается в популяциях китайского происхождения (CHB 7.8%) (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population).

Ближайшим геном, расположенным на расстоянии около 178 тпн от данного полиморфного локуса rs73254185, является ген *PI4K2B*. *PI4K2B* кодирует фермент фосфатидилинозит-4-киназу, являющуюся членом фосфоинозитид (PI) сигнального пути, состоит из десяти экзонов и имеет протяженность около 45 тпн. Основной функцией фермента фосфатидилинозит-4-киназы является фосфорилирование фосфатидилинозитола и превращение его в фосфатидилинозит-4-фосфат. В данном гене идентифицировано 397 ОНП. Данные исследований последних лет свидетельствуют о вовлеченности фосфоинозитид сигнального пути в патогенез шизофрении, биполярного расстройства и других психических заболеваний. Связывается это с его влиянием на регуляцию актинового цитоскелета и формирование дендритных шипиков и развитие синапсов в нервной ткани [11]. *PI4K2B* ассоциируется с синдромом дефицита внимания, логической памяти, гиперактивностью (СДВГ), а также с аномалиями миграции нейронов [12].

Исследования последних 15 лет ясно показали, что PI4P сам по себе является регуляторным липидом, который функционирует в аппарате Гольджи и в эндосомальных мембранах, где контролирует везикулярный транспорт [13]. Это открытие, меняющее парадигму, поместило PI4P в центр гомеостатического клеточного механизма липидов. Исследования на мышах показали серьезные де-

фекты миелинизации Шванновских клеток у нокауты по *PI4KA* и *PI4KB*, а также спиноцереbellарную дегенерацию нокауты гена *PI4K2A* [14, 15]. Получены доказательства изменения молекул, связанных с *PI* в посмертной префронтальной коре у больных шизофренией [11]. В этом свете общей нитью между ферментами *PI4K* является их критическое участие в создании липидного ландшафта клеток млекопитающих, особенно в развитии нейронов и пластичности [16]. Генетические исследования животных и человека предполагают жизненно важную роль ферментов *PI4K* в развитии и функции различных органов, в том числе нервной системы [11, 16].

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs73254185* показал, что генотип *rs73254185*G/G* у больных ПШ встречается с более высокой частотой (98.76%), чем у индивидов контрольной группы (93.38%) ($p = 1.6E-08$; $OR = 5.66$, $CI95\% 2.86-12.45$). При введении поправки на множественное сравнение для оценки доли ложноположительных результатов, проведенной с помощью метода FDR (False Discovery Rate), уровень значимости p остался статистически значимым — $p_{fdr} = 6.45E-04$. Генотип *rs73254185*A/G*, напротив, чаще встречается в группе контроля — в 6.62% случаев по сравнению с 1.24% больных. Показатель отношения шансов для генотипа *rs73254185*A/G* составил 0.18 ($CI95\% 0.08-0.35$, $p = 1.6E-08$; $p_{fdr} = 7.52E-04$). Частота гомозиготного генотипа *rs73254185*A/A* составила 0.00% как у больных, так и у здоровых (табл. 2).

Аллель *rs73254185*G*, определенный с частотой 99.38 у больных и 96.69% в контрольной группе, является маркером повышенного риска развития ПШ ($p = 1.37E-07$; $p_{fdr} = 0.0116$; $OR = 5.5$, $CI95\% 2.79-12.06$). Аллель *rs73254185*A*, соответственно, является маркером пониженного риска ($OR = 0.18$, $CI95\% 0.08-0.36$) (табл. 2). Анализ распределения частот генотипов и аллелей ОНП *rs73254185*, локализованного в области 4p15.2, у больных и индивидов контрольных групп различной этнической принадлежности показал наличие выраженных различий между группами сравнения русских и татар (табл. 2).

Наиболее выраженная ассоциация ПШ с *rs73254185*, локализованным в области 4p15.2, была выявлена у русских. При этом частота аллеля *rs73254185*A* у русских больных ПШ (0.63%) была значительно ниже, чем у здоровых (3.84%) ($p = 5.1E-04$; $OR = 0.16$, $CI95\% 0.06-0.46$). Однако после введения поправки на множественные сравнения FDR данные различия оказались статистически не достоверны ($p_{fdr} = 0.999$) (табл. 2). Анализируя ассоциацию ОНП *rs73254185* с ПШ у татар, мы обнаружили статистически значимые различия между группами больных и контролем с уровнем значимости $p = 1.77E-03$. Показатель от-

ношения шансов для аллеля *rs73254185*A*, определенного с частотой 0.42 у больных и 2.82% в контроле, составил 0.14 ($CI95\% 0.04-0.47$). После введения поправки FDR, различия оказались статистически не достоверны ($p_{fdr} = 0.942$). У больных ПШ башкир аллель *rs73254185*A* также встречался реже, чем в контрольной группе (1.09% vs 3.25%), но различия оказались не достоверны ($p = 0.082$; $p_{fdr} = 0.908$) (табл. 2).

Таким образом, при анализе ассоциации полиморфного варианта области 4p15.2 с учетом этнической принадлежности индивидов было показано, что ассоциация, установленная нами с полногеномным уровнем значимости на объединенной группе больных и контроля, наблюдается также с разной степенью выраженности и в отдельных этнических группах — русских, татар и башкир, что соответствует данным других исследований, согласно которым данная хромосомная область ассоциирована с шизофренией в популяциях европеоидного и азиатского происхождения [17–21].

Литературных данных, посвященных изучению ассоциации полиморфного локуса *rs73254185* с параноидной шизофренией, психическими заболеваниями и другими многофакторными заболеваниями, не найдено. Однако к настоящему времени имеется ряд работ, в которых изучали ассоциацию ОНП, расположенных в области 4p15.2 с шизофренией и другими психическими заболеваниями в различных популяциях. Было установлено сцепление хромосомной области 4p15-p16 с биполярным расстройством и большим депрессивным расстройством с высоким уровнем значимости в шотландских семьях [22], а также с шизофренией и биполярным расстройством у европейцев [20]. Гаплотипический анализ выявил ассоциацию региона размером 20 Mb в хромосомной области 4p15.2 с семейными случаями шизофрении и шизоаффективным расстройством у валлийцев [17, 19], а также в большой группой евреев ашкенази с семейным случаем биполярного расстройства и шизофрении [18]. Установлены ассоциации с высоким уровнем значимости ряда генов в хромосомной области 4p15.2: *KIAA0746*, *ССКАR*, *DKFZp761B107* — с шизофренией и биполярным расстройством у шотландцев [19], *ССКАR* — у китайцев, японцев и испанцев [23], *PI4K2B* — у зависимых от канабиса европейцев и афро-американцев [24].

Помимо этого было установлено, что ОНП *rs10939038*, являющийся потенциально важным генетическим маркером риска развития шизофрении, находится в сильном неравновесии по сцеплению с полиморфными маркерами гена *PI4K2B*; этой группой исследователей было выдвинуто предположение о том, что *PI4K2B* является важным геном-кандидатом шизофрении [19]. Показана ассоциация гаплотипа, состоящего из двух ОНП (*rs10939038/rs17408391*), локализованных в

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов rs73254185 и rs587778384 гена *GNAS* в выборках больных параноидной шизофренией и в контрольных группах различной этнической принадлежности

Генотипы/ аллели	rs73254185					rs587778384				
	A/A	A/G	G/G	A	G	T/T	T/C	C/C	T	C
Больные, <i>n</i>	0	10	799	10	1608	0	5	807	5	1619
В целом										
	$p_i \pm sp$ CI (%)									
	–	1.24 ± 0.39 0.59–2.26	98.76 ± 0.39 97.74–99.41	0.62 ± 0.2 0.3–1.13	99.38 ± 0.2 98.87–99.7	–	0.62 ± 0.28 0.2–1.43	99.38 ± 0.28 98.57–99.8	0.31 ± 0.14 0.1–0.72	99.69 ± 0.14 99.28–99.9
Контроль, <i>n</i>	0	64	903	64	1870	0	59	924	59	1907
	–	6.62 ± 0.8 5.13–8.37	93.38 ± 0.8 91.63–94.87	3.31 ± 0.41 2.56–4.21	96.69 ± 0.41 95.79–97.44	–	6 ± 0.76 4.6–7.67	94 ± 0.76 92.33–95.4	3 ± 0.38 2.29–3.85	97 ± 0.38 96.15–97.71
<i>p</i>	–	1.6E-08	1.6E-08	3.7E-07	3.7E-07	–	2.0E-09	2.0E-09	6.13E-07	6.13E-07
<i>P_{adj}</i>	–	7.52E-04	6.45E-04	0.012	0.012	–	2.82E-04	1.82E-04	0.017	0.017
OR (CI95%)	–	0.18 (0.08–0.35)	5.66 (2.86–12.45)	0.18 (0.08–0.36)	5.5 (2.79–12.06)	–	0.1 (0.04–0.25)	10.31 (4.12–25.81)	0.1 (0.04–0.25)	10.02 (4.01–25.03)
Русские										
Больные, <i>n</i>	0	4	312	4	628	0	0	318	0	636
	–	1.27 ± 0.63 0.35–3.21	98.73 ± 0.63 96.79–99.65	0.63 ± 0.31 0.17–1.61	99.37 ± 0.31 98.39–99.83	0	0	100.0	0	100.0
Контроль, <i>n</i>	0	30	361	30	752	0	26	371	26	768
	–	7.67 ± 1.35 5.24–10.77	92.33 ± 1.35 89.23–94.76	3.84 ± 0.69 2.6–5.43	96.16 ± 0.69 94.57–97.4	–	6.55 ± 1.24 4.32–9.45	93.45 ± 1.24 90.55–95.68	3.27 ± 0.63 2.15–4.76	96.73 ± 0.63 95.24–97.85
<i>p</i>	–	7.5E-05	7.5E-05	5.1E-04	5.1E-04	–	8.7E-06	8.7E-06	8.1E-03	8.1E-03
<i>P_{adj}</i>	–	0.999	0.96	0.999	0.999	–	0.819	0.614	1.354	1.354
OR (CI95%)	–	0.15 (0.05–0.43)	6.48 (2.26–18.6)	0.16 (0.06–0.46)	6.26 (2.19–17.86)	–	0.02 (0–0.15)	45.44 (6.14–336.28)	0.02 (0–0.15)	43.9 (5.95–323.97)

Таблица 2. Окончание

		rs73254185				rs587778384				
Генотипы/ аллели	A/A	A/G	G/G	A	G	T/T	T/C	C/C	T	C
Татары										
Больные, <i>n</i>	0	3	352	3	707	0	1	354	1	709
	–	0.85 ± 0.49 0.17–2.45	99.15 ± 0.49 97.55–99.83	0.42 ± 0.24 0.09–1.23	99.58 ± 0.24 98.77–99.91	–	0.28 ± 0.28 0.01–1.56	99.72 ± 0.28 98.44–99.99	0.14 ± 0.14 0–0.78	99.86 ± 0.14 99.22–100
Контроль, <i>n</i>	0	21	351	21	723	0	22	357	22	736
	–	5.65 ± 1.2 3.53–8.5	94.35 ± 1.2 91.5–96.47	2.82 ± 0.61 1.76–4.28	97.18 ± 0.61 95.72–98.24	–	5.8 ± 1.2 3.67–8.66	94.2 ± 1.2 91.34–96.33	2.9 ± 0.61 1.83–4.36	97.1 ± 0.61 95.64–98.17
<i>p</i>	–	2.9E-04	2.9E-04	1.7E-03	1.7E-03	–	4.5E-05	4.5E-05	2.64E-03	2.64E-03
<i>p</i> _{fidr}	–	0.999	0.999	0.942	0.942	–	0.999	0.977	0.945	0.945
OR (CI95%)	–	0.14 (0.04–0.47)	7.02 (2.08–23.75)	0.15 (0.04–0.51)	6.85 (2.03–23.07)	–	0.05 (0.01–0.37)	21.82 (2.93–162.76)	0.05 (0.01–0.37)	21.19 (2.85–157.63)
Башкиры										
Больные, <i>n</i>	0	3	134	3	271	0	4	134	4	272
	–	2.19 ± 1.25 0.45–6.27	97.81 ± 1.25 93.73–99.55	1.09 ± 0.63 0.23–3.17	98.91 ± 0.63 96.83–99.77	–	2.9 ± 1.43 0.8–7.26	97.1 ± 1.43 92.74–99.2	1.45 ± 0.72 0.4–3.67	98.55 ± 0.72 96.33–99.6
Контроль, <i>n</i>	0	13	187	13	387	0	11	192	11	395
	–	6.5 ± 1.74 3.51–10.86	93.5 ± 1.74 89.14–96.49	3.25 ± 0.89 1.74–5.49	96.75 ± 0.89 94.51–98.26	–	5.42 ± 1.59 2.74–9.49	94.58 ± 1.59 90.51–97.26	2.71 ± 0.81 1.36–4.8	97.29 ± 0.81 95.2–98.64
<i>p</i>	–	0.068	0.068	0.082	0.082	–	0.398	0.398	0.273	0.273
<i>p</i> _{fidr}	–	0.903	0.903	0.908	0.908	–	0.981	0.981	0.968	0.968
OR (CI95%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. *n* – численность группы, *p*_{fidr} – частота аллеля (генотипа), *sp* – ошибка *p*, CI95% – доверительный интервал, *p* – уровень значимости, χ^2 (*P*) – равновесие Харди–Вайнберга в изученных группах.

Таблица 3. ОНП, локализованные в области 20q13.31 и ассоциированные с параноидной шизофренией

Ген	№ rs	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля T, больные, %	Частота аллеля A, контроль, %	Аллель 2	p	p _{fidr}	OR
GNAS	rs587778384	g.20064C>T	T	0.0031	0.03001	C	6.13E-07	0.017	0.097
–	rs6015320	g.57205047G>A	A	0.386	0.43	G	0.0072	0.900	0.830

хромосомной области гена *PI4K2B* (4p15.2), с шизофренией у шотландцев; что еще раз демонстрирует возможную вовлеченность гена *PI4K2B* в этиопатогенез шизофрении [25], а также подтверждает данные ранее проведенных исследований [17]. Полногеномное исследование выявило ассоциацию ОНП rs17390445 (в области 4p15) с эффективностью атипичного нейролептика zipрасидона у европейцев [21].

Кроме того, была установлена ассоциация хромосомной области 4p15.2 с развитием моторной алалии у детей с расстройствами аутистического спектра [26]. Показана связь микроделеции в области 4p15.2 с развитием синдрома Аксенафельда–Ригера, характеризующегося задержкой развития [27]. Выявлено, что *de novo* дупликация 4p15.2 может приводить к глобальной задержке развития и когнитивным нарушениям [28].

Анализ ассоциации параноидной шизофрении с полиморфными локусами, локализованными в области 20q13.31

При полногеномном исследовании объединенной группы больных и контроля также установлена выраженная ассоциация ПШ с однонуклеотидными полиморфными локусами, локализованным в области 20q13.31 (рис. 1, табл. 3). Наиболее высокий уровень ассоциации с болезнью среди локусов данной области показал ОНП rs587778384 ($p = 6.13E-07$), локализованный на длинном плече хромосомы 20 в области q13.31 в интронной области гена *GNAS*. Ген *GNAS* состоит из 13 экзонов, охватывает около 71 тпн геномной ДНК. В настоящее время в гене *GNAS* идентифицировано 646 ОНП. Известно, что ген *GNAS* импринтирует паттерн экспрессии множественных транскриптов, включая альфа-субъединицу стимулирующего гуанин нуклеотид-связывающий белок ($G\alpha_s$), сверхбольшую $G\alpha_s$ ($XL\alpha_s$), нейроэндокринный секреторный белок NESP55 [29]. Помимо этого еще два дополнительных А/В, или (1А или 1'), и GNAS-антисмысловой транскрипт (GNAS-AS1), являющиеся некодирующими, хотя существуют предположения о том, что транскрипт А/В может транслироваться [30].

Среди множества различных механизмов, вовлеченных в этиологию шизофрении, результаты

нескольких исследований подтверждают предположение о том, что дисрегуляция сигнальной трансдукции нейротрансмиттеров и повышенная уязвимость к апоптозу [31, 32] могут играть роль в патологической биологии данного заболевания. В этом случае гетеротримерные гуанин нуклеотид-связывающие белки, известные как G-белки, могут обеспечить интригующую связь между гипотезой сигнальной трансдукции и гипотезой апоптоза развития шизофрении [33]. Изменения во внутриклеточном сигнальном пути G-белка обнаружены у больных шизофренией, а также известно об использовании G-белков в качестве биохимических маркеров диагностики шизофрении и мониторинге ответа на антипсихотическую терапию [34].

Относительно апоптотической гипотезы шизофрении было доказано, что механизмы сигнальной трансдукции G-белков играют критическую роль в регуляции запрограммированной клеточной смерти, а эксперименты *in vitro* показали, что активация G-белков может приводить к нейрональному апоптозу в культурах клеточных линий [35]. Согласно данным многочисленных исследований *post-mortem*, в различных отделах головного мозга больных шизофренией обнаружен дисбаланс регуляторных белков апоптоза [31]. Описанные данные указывают на возможную взаимосвязь G-белков и шизофрении, а также, что гены, кодирующие G-белки, могут быть вовлечены в развитие шизофрении. Ген *GNAS*, кодирующий экспрессирующийся повсеместно $G\alpha_s$, вызывает огромный интерес при рассмотрении его в качестве гена-кандидата шизофрении по целому ряду причин. Во-первых, субъединица $G\alpha_s$ играет ключевую роль в связывании рецепторов дофамина D1/D5 с аденилатциклазой [36]. В связи с этим трансгенные мыши, экспрессирующие активную форму $G\alpha_s$, представляют идеальную модель определенных эндофенотипов шизофрении [37]. Согласно гипотезе апоптоза при шизофрении было выявлено, что повышенная экспрессия $G\alpha_s$ активирует каскад сигнальной трансдукции аденилатциклазы, приводящий к аккумуляции вторичного внутриклеточного мессенджера цАМФ, являющегося главным игроком в проапоптотических процессах [32].

Существует целый ряд исследований, выявивший повышенную экспрессию белка $G\alpha_s$ у больных с биполярным расстройством по сравнению с контролем, но который был ниже у больных с униполярной депрессией [38]. В основе данного механизма лежит изменение уровня нейронального апоптоза в головном мозге, дисрегуляции активности дофаминового рецептора D1 (DRD1) [36, 37], влияние на гипоталамо-гипофизарную ось [39] и дисрегуляция цАМФ сигнального пути [40].

Ген *GNAS* кодирует нейроэндокринный белок NESP55, экспрессирующийся с материнского аллеля [41]. NESP55 высоко экспрессируется в ряде структур головного мозга, включая гипоталамус, в серотонинергических нейронах в дорсальном ядре шва, а также в голубом пятне [41]. Известно, что белок NESP55 является специфическим антагонистом рецептора серотонина 5HT1B [42]. Мыши-нокауты по NESP55 (со сниженной экспрессией с материнского аллеля) демонстрировали нормальные параметры роста, гиперактивность и аномально высокое избегание попадания в новые условия [41].

Таким образом, в ходе описанных экспериментов на моделях мышей, было представлено два эндотипа, свойственных расстройствам аутистического спектра: отращивание к новизне, являющееся основной особенностью данных расстройств и гиперактивность, которая особенно распространена при аутизме, особенно в раннем детстве [43]. Однако различия в когниции и поведении человека и мышей серьезно ограничивают силу таких заключений. Известно, что ген *GNAS* также взаимодействует с геном *FMRI*, являющимся каузальным для расстройства аутистического спектра синдромом ломкой хромосомы [44].

Некоторые мутации и эпигенетические нарушения в гене *GNAS* приводят к нарушению метаболизма в щитовидной железе [45, 46], включая гипотиреозидизм, обусловленный изменением экспрессии *GNAS*-транскрипта в щитовидной железе [46]. Гипотиреозидизм, и гиперпаратиреозидизм, псевдогипопаратиреозидизм и псевдопсевдогипопаратиреозидизм каузально сцеплены с некоторыми формами психозов, включая синдром Капгра (бред отрицания двойника), бред ошибочного узнавания, которые как правило характерны для параноидной шизофрении [47]. Однако, несмотря на то, что психоз является относительно общим признаком гипотиреоза, он нехарактерен для двух других основных заболеваний, связанных с дисрегуляцией функции гена *GNAS* (синдром МакКьюн–Олбрайта и наследственная остеодистрофия Олбрайта). Таким образом, характер функциональных связей между уровнем экспрессии транскриптов гена *GNAS*, заболеваниями щитовидной железы и психозами требуют дальнейшего изучения [48].

Китайскими учеными было показано, что измененный импринтинг *GNAS* из-за дефицита фолиевой кислоты способствует задержке внутриутробного развития плода и может приводить к развитию дефекта нервной трубки [49]. Гиперметилирование промотора *GNAS* в базолатеральном миндалевидном теле регулирует реконсолидацию памяти опиоидной системы вознаграждения у крыс [50]. Группа корейских исследователей установила ассоциацию малых геномных делеций в гене *GNAS* с риском развития болезни Паркинсона [51]. Частота аллеля *rs587778384*T* в различных популяциях составила 0.1% (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad-hoc_search&type=rs&rs=rs587778384).

Проведенный в настоящей работе анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs587778384* гена *GNAS* показал, что генотип *rs587778384*C/C* встречался у больных ПШ с более высокой частотой (99.38%), чем в контрольной группе (94.0%) ($p = 2.0E-09$; OR = 10.31, CI95% 4.12–25.81). При введении поправки FDR (False Discovery Rate) уровень значимости p остался статистически значимым ($p_{\text{fdr}} = 1.82E-04$) (табл. 2). Гетерозиготный генотип *rs587778384*T/C*, напротив, чаще встречается в группе контроля – в 6.00% случаев, по сравнению с 0.62% у больных. Показатель отношения шансов для генотипа *rs587778384*T/C* составил 0.1 (CI95% 0.04–0.25), $p = 2.0E-09$; $p_{\text{fdr}} = 2.82E-04$ (рис. 1, табл. 2). Частота гомозиготного генотипа *rs587778384*T/T* составила 0.00% и у больных, и у здоровых.

Аллель *rs587778384*C*, обнаруженный с частотой 99.69 у больных и 97.0% у здоровых индивидов, является, соответственно, маркером повышенного риска развития данного заболевания ($p = 6.13E-07$; $p_{\text{fdr}} = 0.017$; OR = 10.02, CI95% 4.01–25.03), а аллель *rs587778384*C* – маркером пониженного риска развития ПШ ($p = 6.13E-07$; $p_{\text{fdr}} = 0.017$; OR = 0.1, CI95% 0.04–0.25).

Анализ ассоциации полиморфного варианта *rs587778384* гена *GNAS*, локализованного в области 20q13.31 в различных этнических группах показал существование наиболее выраженных различий в распределении частот аллелей ОНП *rs587778384* между сравниваемыми группами больных и контроля у татар (табл. 2). Аллель *rs587778384*C* у больных ПШ татар по этнической принадлежности встречался значительно чаще (99.86%), чем в группе контроля (97.1%) ($p = 2.64E-03$; OR = 21.19, CI95% 2.85–157.63). Частота аллеля *rs587778384*T* у больных (0.14%) была выше, чем у здоровых татар (2.9%) ($p = 2.64E-03$; OR = 0.05, CI95% 0.01–0.37). Однако после введения поправки FDR различия оказались статистически не достоверны ($p_{\text{fdr}} = 0.945$) (табл. 2). Распространенность аллеля *rs587778384*C* у русских больных ПШ была выше (100.0%), чем у здоровых русских (96.73%) ($p =$

= 8.1E-03; $p_{\text{idr}} = 1.354$; OR = 43.9, CI95% 5.95–323.97). Частота аллеля *rs587778384*T* у больных составила (0.00%), а у здоровых (3.27%) ($p = 8.1E-03$; $p_{\text{idr}} = 1.354$; OR = 0.02, CI95% 0–0.15). Аллель *rs587778384*C* у больных ПШ башкир встречался чаще (98.55%), чем в группе контроля (97.29%), однако различия оказались статистически незначимыми ($p = 0.273$; $p_{\text{idr}} = 0.968$) (табл. 2).

Литературных данных, посвященных изучению ассоциации ОНП *rs587778384* с параноидной шизофренией, психическими заболеваниями и другими многофакторными заболеваниями, не найдено. Однако к настоящему времени имеется ряд работ, в которых изучали ассоциацию полиморфных локусов, расположенных в области 20q13.31, с шизофренией и других психических заболеваниях в различных популяциях.

Известно, что полиморфный локус *C393T* гена *GNAS*, представляющий синонимичную замену, может влиять на экспрессию *Gαs*. У индивидов с генотипом *C393T*T/T* отмечена повышенная экспрессия *Gαs*, а также большая уязвимость к апоптозу в различных типах клеток [52]. В связи с этим Р. Minoretti с соавт. предположили, что генотип *C393T*T/T* гена *GNAS* может придавать повышенную предрасположенность к развитию шизофрении. В результате проведенного исследования данными авторами была выявлена ассоциация генотипа *C393T*T/T* (*rs7121*) с негативной симптоматикой у больных шизофренией итальянцев [33]. В GWAS-исследовании L. Athanasiu с соавт. было показано, что полиморфный локус *rs6100223*, находящийся на расстоянии 58 тпн от гена *GNAS*, был ассоциирован с шизофренией с достаточно высоким уровнем значимости ($p = 5.95E-04$) у норвежцев [53].

В ходе полногеномного ассоциативного исследования с участием 2454 больных шизофренией европейского происхождения с позитивной и негативной и общепсихопатологической симптоматикой, ни один ОНП не достиг полногеномного уровня значимости $1.67E-08$. Однако выявлен ряд генов и хромосомных областей (среди которых был полиморфный локус, расположенный в хромосомной области 20q13.31), ассоциированных с шизофренией с высоким уровнем значимости, как с позитивной симптоматикой (*rs11699237*, $p = 9.96E-06$), так и с негативной (*rs11699237*, $p = 3.13E-06$) [54].

Известно, что мозговые осцилляции являются характерными чертами активных нейронных сетей, с определенной частотой ритмы коррелируют с чувственным восприятием и когнитивной деятельностью, в том числе в сознании, памяти и обработки стимула. В результате проведенного полногеномного исследования у 771 больного европейского и 293 афроамериканского происхождения была показана ассоциация полиморфных локусов

rs13831 ($p = 6.04E-05$) и *rs6026576* ($p = 7.79E-06$) гена *GNAS* с данным эндотипом у больных алкоголизмом [55].

Р. Minoretti с соавт. была выявлена ассоциация генотипа *C393T*T/T* гена *GNAS* с повышенной экспрессией белка *Gαs* и риском развития шизофрении с негативной симптоматикой. Данные результаты, как и полученные в ходе опытов на мышах [33], позволяют предположить, что высокий уровень экспрессии импринтированного гена с материнского аллеля ассоциирован с шизофренией [48]. Было установлено, что дифференциальное метилирование в генах импринтинга, включая ген *GNAS*, указывает на то, что в основе синдрома делеции 22q11.2DS при шизофрении лежат нарушения нейронального развития [56]. По данным ряда полногеномных исследований известно о сцеплении хромосомной области 20q13 с биполярным расстройством у индивидов средне-восточного (Израиль) и европейского происхождения [57, 58].

Таким образом, в настоящем исследовании впервые установлена ассоциация однонуклеотидных полиморфных вариантов: *rs73254185* (локализованного в области 4p15.2) и *rs587778384* гена *GNAS* (20q13.31) – с развитием параноидной шизофрении у индивидов различной этнической принадлежности, русских, татар и башкир, проживающих в Республике Башкортостан, что вероятно может свидетельствовать о вовлеченности локализованных в данных хромосомных областях генов *PI4K2B* и *GNAS* в патогенез шизофрении. Однако для подтверждения полученных результатов необходимо провести репликативные исследования.

Автор выражает огромную благодарность сотрудникам департамента Психиатрической медицины и клинических нейронаук Кардиффского Университета (г. Кардифф, Великобритания) М. O'Donovan, V. Escott-Price, M. Owen, G. Leonenko за советы по генерации и анализу данных и участию в проекте.

Также благодарна директору ИБГ УФИЦ РАН проф. Э.К. Хуснутдиновой за научное консультирование, экс-главному врачу РКПБ № 1 Р.Г. Валинурову за помощь в организации забора материала в 2008–2012 гг.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trubetskoy V., Pardiñas A.F., Qi T. et al.* Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature*. 2022. V. 604. № 7906. P. 502–508.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
2. *Singh T., Poterba T., Curtis D. et al.* Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia // *Nature*. 2022. V. 604. P. 509–516.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04556-w>
3. *Periyasamy S., John S., Padmavati R. et al.* Association of schizophrenia risk with disordered niacin metabolism in an Indian genome-wide association study // *JAMA Psychiatry*. 2019. V. 76. № 10. P. 1026–1034.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1335>
4. *Fiorica P.N., Wheeler H.E.* Transcriptome association studies of neuropsychiatric traits in African Americans implicate PRMT7 in schizophrenia // *Peer J*. 2019. V. 26. № 7.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7778>
5. *Bigdeli T.B., Genovese G., Georgakopoulos P. et al.* Contributions of common genetic variants to risk of schizophrenia among individuals of African and Latino ancestry // *Mol. Psychiatry*. 2020. V. 25. № 10. P. 2455–2467.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0517-y>
6. *Ikeda M., Takahashi A., Kamatani Y. et al.* Genome-wide association study detected novel susceptibility genes for schizophrenia and shared trans-populations/diseases genetic effect // *Schizophr. Bull.* 2019. V. 45. № 4. P. 824–834.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sby140>
7. *Lam M., Chen C.Y., Li Z. et al.* Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678.
<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
8. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575.
<https://doi.org/10.1086/519795>
9. *Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N., Golani I.* Controlling the false discovery rate in behavior genetics research // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. № 1–2. P. 279–284.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2)
10. *Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M. et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. № 8. P. 904–909.
<https://doi.org/10.1038/ng1847>
11. *Kunii Y., Matsumoto J., Izumi R. et al.* Evidence for altered phosphoinositide signaling-associated molecules in the postmortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158280>
12. *Yates A.D., Achuthan P., Akanni W. et al.* Ensembl 2020 // *Nucl. Ac. Res.* 2020. V. 48. № D1. P. D682–D688.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz966>
13. *Minogue S.* The many roles of type ii phosphatidylinositol 4-kinases in membrane trafficking: New tricks for old dogs // *Bioessays*. 2018. V. 40. № 2. P. 10.
<https://doi.org/10.1002/bies.201700145>
14. *Baba T., Alvarez-Prats A., Kim Y.J. et al.* Myelination of peripheral nerves is controlled by PI4KB through regulation of Schwann cell Golgi function // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 45. P. 28102–28113.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2007432117>
15. *Alvarez-Prats A., Bjelobaba I., Aldworth Z. et al.* Schwanncell – specific deletion of phosphatidylinositol 4-kinase alpha causes aberrant myelination // *Cell Rep.* 2018. V. 23. № 10. P. 2881–2890.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.019>
16. *Dafsari H.S., Pemberton J.G., Ferrer E.A. et al.* PI4K2A deficiency causes innate error in intracellular trafficking with developmental and epileptic-dyskinetic encephalopathy // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2022. V. 9. № 9. P. 1345–1358.
<https://doi.org/10.1002/acn3.51634>
17. *Asherson P., Mant R., Williams N. et al.* A study of chromosome 4p markers and dopamine D5 receptor gene in schizophrenia and bipolar disorder // *Mol. Psychiatry*. 1998. V. 3. № 4. P. 310–320.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000399>
18. *Detera-Wadleigh S.D., Badner J.A., Berrettini W.H. et al.* A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. № 10. P. 5604–5609.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5604>
19. *Christoforou A., Le Hellard S., Thomson P.A. et al.* Association analysis of the chromosome 4p15–p16 candidate region for bipolar disorder and schizophrenia // *Mol. Psychiatry*. 2007. V. 12. № 11. P. 1011–1025.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002003>
20. *Le Hellard S., Theisen F.M., Haberhausen M. et al.* Association between the insulin-induced gene 2 (*INSIG2*) and weight gain in a German sample of antipsychotic-treated schizophrenic patients: perturbation of SREBP-controlled lipogenesis in drug-related metabolic adverse effects? // *Mol. Psychiatry*. 2009. V. 14. № 3. P. 308–317.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002133>
21. *McClay J.L., Adkins D.E., Aberg K. et al.* Genome-wide pharmacogenomic study of neurocognition as an indicator of antipsychotic treatment response in schizophrenia // *Neuropsychopharmacology*. 2011. V. 36. № 3. P. 616–626.
<https://doi.org/10.1038/npp.2010.193>
22. *Blackwood D.H., He L., Morris S.W. et al.* A locus for bipolar affective disorder on chromosome 4p // *Nat. Genet.* 1996. V. 12. № 4. P. 427–430.
<https://doi.org/10.1038/ng0496-427>
23. *Chen F.P., Wu L., Shen Y. et al.* // *Acta Acad. Med. Sinicae*. 2014. V. 36. № 5. P. 466–469.
<https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.2014.05.002>
24. *Sherva R., Wang Q., Kranzler H. et al.* Genome-wide association study of cannabis dependence severity, novel risk variants, and shared genetic risks // *JAMA Psychiatry*. 2016. V. 73. № 5. P. 472–480.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0036>
25. *Houlihan L.M., Christoforou A., Arbuckle M.I. et al.* A case-control association study and family-based ex-

- pression analysis of the bipolar disorder candidate gene PI4K2B // *J. Psychiatr. Res.* 2009. V. 43. № 16. P. 1272–1277.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.05.004>
26. *Flax J.F., Hare A., Azaro M.A. et al.* Combined linkage and linkage disequilibrium analysis of a motor speech phenotype within families ascertained for autism risk loci // *J. Neurodev. Disord.* 2010. V. 2. № 4. P. 210–223.
<https://doi.org/10.1007/s11689-010-9063-2>
 27. *Maldžienė Ž., Preikšaitienė E., Ignotienė S. et al.* A *de novo* pericentric inversion in chromosome 4 associated with disruption of PITX2 and a microdeletion in 4p15.2 in a patient with axenfeld-riege syndrome and developmental delay // *Cytogenet. Genome Res.* 2017. V. 151. № 1. P. 5–9.
<https://doi.org/10.1159/000456695>
 28. *Liang L., Xie Y., Shen Y. et al.* A rare *de novo* interstitial duplication at 4p15.2 in a boy with severe congenital heart defects, limb anomalies, hypogonadism, and global developmental delay // *Cytogenet. Genome Res.* 2016. V. 150. № 2. P. 112–117.
<https://doi.org/10.1159/000454698>
 29. *Turan S., Bastepe M.* GNAS spectrum of disorders // *Curr. Osteoporos Rep.* 2015. V. 13. № 3. P. 146–158.
<https://doi.org/10.1007/s11914-015-0268-x>
 30. *Puzhko S., Goodyer C.G., Kerachian M.A. et al.* Parathyroid hormone signaling via Gαs is selectively inhibited by an NH(2)-terminally truncated Gαs: Implications for pseudohypoparathyroidism // *J. Bone Miner. Res.* 2011. V. 26. № 10. P. 2473–2485.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.461>
 31. *Jarskog L.F., Gilmore J.H., Selinger E.S., Lieberman J.A.* Cortical bcl-2 protein expression and apoptotic regulation in schizophrenia // *Biol. Psychiatry.* 2000. V. 48. № 7. P. 641–650.
[https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(00\)00988-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(00)00988-4)
 32. *Jarskog L.F., Glantz L.A., Gilmore J.H., Lieberman J.A.* Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2005. V. 29. № 5. P. 846–858.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.03.010>
 33. *Minoretti P., Politi P., Coen E. et al.* The T393C polymorphism of the GNAS1 gene is associated with deficit schizophrenia in an Italian population sample // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 397. № 1–2. P. 159–163.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.028>
 34. *Song X., Li X., Gao J. et al.* APOA-I: A possible novel biomarker for metabolic side effects in first episode schizophrenia // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093902>
 35. *Zheng J., Thylin M.R., Ghorpade A. et al.* Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia // *J. Neuroimmunol.* 1999. V. 98. № 2. P. 185–200.
[https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00049-1)
 36. *Jin L.Q., Wang H.Y., Friedman E.* Stimulated D1 dopamine receptors couple to multiple G alpha proteins in different brain regions // *J. Neurochem.* 2001. V. 78. № 5. P. 981–990.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00470.x>
 37. *Gould T.J., Bizily S.P., Tokarczyk J. et al.* Sensorimotor gating deficits in transgenic mice expressing a constitutively active form of Gs alpha // *Neuropsychopharmacology.* 2004. V. 29. № 3. P. 494–501.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300309>
 38. *Avissar S., Schreiber G.* The involvement of G proteins and regulators of receptor G protein coupling in the pathophysiology, diagnosis and treatment of mood disorders // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 366. № 1. P. 37–47.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.11.003>
 39. *Strawn J.R., Ekhator N.N., D'Souza B.B., Geraciotti T.D., Jr.* Pituitary-thyroid state correlates with central dopaminergic and serotonergic activity in healthy humans // *Neuropsychobiology.* 2004. V. 49. № 2. P. 84–87.
<https://doi.org/10.1159/000076415>
 40. *Hattori E., Liu C., Zhu H., Gershon E.S.* Genetic tests of biologic systems in affective disorders // *Mol. Psychiatry.* Genetic tests of biologic systems in affective disorders // *Mol. Psychiatry.* 2005. V. 10. № 8. P. 719–740.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001695>
 41. *Plagge A., Gordon E., Dean W. et al.* The imprinted signaling protein XLαs is required for postnatal adaptation to feeding // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 8. P. 818–826.
<https://doi.org/10.1038/ng1397>
 42. *Grimaldi B., Bonnin A., Fillion M.P. et al.* 5-Hydroxytryptamine-moduline: A novel endogenous peptide involved in the control of anxiety // *Neuroscience.* 1999. V. 93. № 4. P. 1223–1225.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00322-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00322-x)
 43. *Gomot M., Bernard F.A., Davis M.H. et al.* Change detection in children with autism: An auditory event-related fMRI study // *Neuroimage.* 2006. V. 29. № 2. P. 475–484.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.07.027>
 44. *Bittel D.C., Kibiryeva N., Butler M.G.* Whole genome microarray analysis of gene expression in subjects with fragile X syndrome // *Genet. Med.* 2007. V. 9. № 7. P. 464–472.
<https://doi.org/10.1097/gim.0b013e3180ca9a9a>
 45. *Bastepe M., Jüppner H.* GNAS locus and pseudohypoparathyroidism // *Horm. Res.* 2005. V. 63. № 2. P. 65–74.
<https://doi.org/10.1159/000083895>
 46. *Germain-Lee E.L., Schwindinger W., Crane J.L. et al.* A mouse model of Albright hereditary osteodystrophy generated by targeted disruption of exon 1 of the Gnas gene // *Endocrinology.* 2005. V. 146. № 11. P. 4697–4709.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-0681>
 47. *Heinrich T.W., Graham G.* Hypothyroidism presenting as psychosis: Myxedema madness revisited // *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry.* 2003. V. 5. № 6. P. 260–266.
<https://doi.org/10.4088/pcc.v05n0603>
 48. *Crespi B.* Genomic imprinting in the development and evolution of psychotic spectrum conditions // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2008. V. 83. № 4. P. 441–493.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00050.x>
 49. *Wang L., Chang S., Wang Z. et al.* Altered GNAS imprinting due to folic acid deficiency contributes to poor embryo development and may lead to neural tube defects // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 67. P. 10797–110810.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.22731>

50. Liu P., Liang J., Jiang F. et al. Gnas promoter hypermethylation in the basolateral amygdala regulates reconsolidation of morphine reward memory in rats // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 3. <https://doi.org/10.3390/genes13030553>
51. Oh J.H., Jo S., Park K.W. et al. Whole-genome sequencing reveals an association between small genomic deletions and an increased risk of developing Parkinson's disease // *Exp. Mol. Med.* 2023. V. 55. № 3. P. 555–564. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00952-y>
52. Frey U.H., Alakus H., Wohlschlaeger J. et al. GNAS1 T393C polymorphism and survival in patients with sporadic colorectal cancer // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 14. P. 5071–5077. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0472>
53. Athanasiu L., Mattingsdal M., Kähler A.K. et al. Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort // *J. Psychiatr. Res.* 2010. V. 44. № 12. P. 748–753. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.02.002>
54. Fanous A.H., Zhou B., Aggen S.H. et al. Genome-wide association study of clinical dimensions of schizophrenia: Polygenic effect on disorganized symptoms // *Am. J. Psychiatry.* 2012. V. 169. № 12. P. 1309–1317. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.12020218>
55. Zlojutro M., Manz N., Rangaswamy M. et al. Genome-wide association study of theta band event-related oscillations identifies serotonin receptor gene HTR7 influencing risk of alcohol dependence // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2011. V. 156. № 1. P. 44–58. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31136>
56. Carmel M., Michaelovsky E., Weinberger R. et al. Differential methylation of imprinting genes and MHC locus in 22q11.2 deletion syndrome-related schizophrenia spectrum disorders // *World J. Biol. Psychiatry.* 2021. P. 22. № 1. P. 46–57. <https://doi.org/10.1080/15622975.2020.1747113>
57. Park N., Juo S.H., Cheng R. et al. Linkage analysis of psychosis in bipolar pedigrees suggests novel putative loci for bipolar disorder and shared susceptibility with schizophrenia // *Mol. Psychiatry.* 2004. V. 9. № 12. P. 1091–1099. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001541>
58. McQueen M.B., Devlin B., Faraone S.V. et al. Combined analysis from eleven linkage studies of bipolar disorder provides strong evidence of susceptibility loci on chromosomes 6q and 8q // *Am. J. Hum. Genet.* 2005. V. 77. № 4. P. 582–595. <https://doi.org/10.1086/491603>

Genome-Wide Association Study: Analysis of Association of Polymorphic Loci in 4p15.2 and 20q13.31 Regions with Paranoid Schizophrenia

A. E. Gareeva^{a, b, *}

^aInstitute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bBashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia

*e-mail: annagareeva@yandex.ru

Over fifteen years, genome-wide association studies (GWAS) have identified several million polymorphic risk markers for schizophrenia, significantly advancing our understanding of the genetic architecture of schizophrenia. The aim of this study was to study genetic risk factors for the development of schizophrenia in a genome-wide association analysis in Russians, Tatars, and Bashkirs from the Republic of Bashkortostan. The studied sample consisted of 816 patients with paranoid schizophrenia and 989 healthy individuals. GWAS genotyping of DNA samples was carried out on the PsychChip, which included 610000 single nucleotide polymorphic variants (SNPs). As a result of the study, for the first time, an association of SNPs rs73254185 (4p15.2) and rs587778384 of the *GNAS* gene (20q13.31) with the risk of paranoid schizophrenia in individuals of different ethnicity, Russians, Tatars and Bashkirs living in the Republic of Bashkortostan, was established, which probably may indicate involvement of *PI4K2B* and *GNAS* genes localized in these chromosomal regions in the pathogenesis of schizophrenia.

Keywords: genetics, schizophrenia, genome-wide association analysis, ethnicity, Republic of Bashkortostan, Psychiatric genome consortium.

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА *MAOA* (rs1137070) И ИНТЕРНЕТ-ЗАВИСИМОСТЬ У ПОДРОСТКОВ

© 2023 г. К. В. Копылова¹, И. В. Марченко¹, М. В. Шубина¹, Н. Н. Горбачева¹,
И. А. Новицкий¹, М. В. Смольникова^{1, *}

¹Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Федеральный исследовательский центр
“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, 660022 Россия

*e-mail: smarinv@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Моноаминоксидаза А (*MAOA*) катализирует распад норадреналина, дофамина и серотонина – нейромедиаторов, участвующих в патогенезе ряда патологических зависимостей, к которым относят и интернет-зависимость (ИЗ). Ген *MAOA* активно исследуется в аспекте генетической предрасположенности в развитии агрессивного поведения, участвующего в формировании зависимости от интернета. В исследование были включены 602 подростка Ангаро-Енисейского макрорегиона (русские $n = 329$, тувинцы $n = 158$, хакасы $n = 158$) в возрастном диапазоне от 9 до 18 лет (средний возраст 14.6 лет, SD 1.7). Тип ИЗ оценивали по шкале Чена (Chen Internet Addiction Scale, CIAS), полиморфизм детектировали с помощью ПЦР-РВ. Выявлено, что частота генотипа *TT* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA*, ассоциированного с низкой активностью фермента *MAOA* и агрессивным поведением на фоне интернет-зависимости, значимо выше у тувинских подростков по сравнению с русскими (31.1 против 21.2%, $p = 0.020$). Патологическая интернет-зависимость (более 65 баллов по шкале Чена) чаще наблюдается среди хакасов по сравнению с русскими подростками (26.4 против 15.5%, $p = 0.028$). Таким образом, наличие аллельного варианта *T* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* является потенциальным маркером склонности к формированию зависимого и агрессивного поведения, а тувинцы и хакасы более подвержены к развитию патологических зависимостей, чем русские подростки.

Ключевые слова: моноаминоксидаза, *MAOA*, полиморфизм, интернет-зависимость, подростки, популяции.

DOI: 10.31857/S0016675823100065, **EDN:** UCMSOE

Интернет-зависимость: термины, история изучения, классификация паттернов зависимого поведения, методы диагностики, эпидемиология

Термин “интернет-зависимость” (ИЗ) означает поведение, побуждающее к чрезмерному использованию гаджетов и доступа в интернет [1, 2]. Данный термин имеет множество синонимов, которые используются как взаимозаменяемые: патологическое использование интернета, интернет-зависимость, компульсивное использование интернета, расстройство интернет-зависимости, интернет-аддикция, проблемное использование интернета.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что несмотря на разные объекты или вещества для получения удовольствия, опосредованные ими патологические зависимости имеют схожие черты. Зависимости, не связанные с употреблением химических веществ, в общем виде представляют собой феномен поведенческого пристрастия. Для лю-

бой зависимости характерны необходимость в наращивании дозы (в случае ИЗ происходит постепенное увеличение времени, проведенного в интернете), модификация образа жизни (у зависимых от интернета виртуальная сеть начинает играть главную роль в повседневной жизни, заменяя собой реальную жизнь), а также синдром отмены (при отсутствии или невозможности доступа в интернет наблюдается ухудшение эмоционального и даже физического состояния) [3].

В 1998 г. К. Янг провела крупное исследование ИЗ среди взрослых пользователей интернета [4], в котором было собрано около 600 людей, страдающих от последствий чрезмерного присутствия интернета в своей повседневной жизни и отсутствия контроля над использованием интернета. Опираясь на практические данные, Янг с соавт. рассматривают ИЗ в качестве обобщающего термина для описания широкого спектра моделей поведения, которые можно классифицировать на пять подтипов:

киберсексуальная зависимость (компульсивное использование сайтов для взрослых); зависимость от киберотношений (чрезмерная вовлеченность в онлайн-отношения и нежелание взаимодействовать с людьми вне глобальной сети); сетевые компульсии (навязчивое желание игры в азартные онлайн-игры, совершать интернет-покупки); информационная перегрузка (избыточный веб-серфинг или постоянный поиск в различных поисковиках) и чрезмерное увлечение компьютерными играми офлайн [5].

До сих пор нет согласованного мнения о конкретных диагностических критериях ИЗ, в связи с чем данное поведенческое расстройство пока не внесено в международные классификации болезней (МКБ-10, DSM-IV). К. Янг был разработан опросник (Internet addiction test, IAT) на основании представлений и тестовых методик диагностики алкоголизма и патологической склонности к азартным играм (online gambling disorder) [4]. Помимо опросника Янг на данный момент для диагностики ИЗ у подростков широко применяется опросник Чена, который позволяет оценить симптомы, являющиеся характерными для ИЗ — толерантность, синдром отмены, компульсивность, дисциплинированность и сила воли, а также наличие внутриличностных проблем [6]. Распространенность ИЗ зависит от этнической принадлежности и методов диагностики: в Европе у подростков она составляет 5–10%, тогда как в Азии (Китае, Южной Корее, Японии) распространенность ИЗ среди подростков значительно выше и достигает 25–30% [7].

Причинами развития зависимостей разного характера являются поведенческие расстройства, связанные с особенностями функционирования нервной системы. Внутри нейронов информация передается в форме электрического потенциала, а между нервными клетками в виде химических веществ — медиаторов. Нейромедиаторы (нейротрансмиттеры) являются биологически активными веществами, увеличение или уменьшение концентрации которых напрямую влияет на скорость передачи сигнала. При развитии патологических зависимостей происходит выброс множества нейромедиаторов, в том числе дофамина, эндорфина и других гормонов “удовольствия” или “счастья”.

Моноаминоксидаза: ген MAOA, полиморфные варианты, ассоциация с заболеваниями

Моноаминоксидаза (MAO) — фермент, катализирующий реакцию окислительного дезаминирования таких нейромедиаторов, как норадреналин, дофамин и серотонин с образованием перекиси водорода [8, 9]. Данный фермент имеет две формы — MAOA, который обладает более высоким сродством к серотонину, норадреналину и дофамину и MAOB, окисляющий фенилэтил-

амин, бензиламин и метаболитированный дофамин [10]. Изоферменты А и В, на 70% сходные по составу аминокислот, кодируются разными генами (MAOA и MAOB соответственно), которые имеют одинаковую экзон-интронную структуру и локализируются на X-хромосоме внешней мембраны митохондрий, что говорит об их общем происхождении [11].

Ввиду функциональной активности моноаминоксидазы, уровень этого фермента может оказывать влияние на настроение и поведение. Так, низкий по сравнению с нормальным уровень MAOA ассоциирован с повышенным риском развития депрессии и импульсивного поведения ввиду накопления в головном мозге нейромедиаторов серотонина и дофамина [12]. Люди с высоким уровнем MAOA менее склонны к развитию некоторых психических расстройств [13]. Способность моноаминоксидазы катализировать деградацию нейротрансмиттеров мозга позволяет использовать препараты на основе ингибиторов данного фермента для терапевтического лечения пациентов с обсессивно-компульсивным расстройством (ОКР) и депрессией [10].

Ген MAOA, также известный как “ген воина” — один из наиболее исследуемых в аспекте изучения генетической предрасположенности развития агрессивного поведения. Описано несколько “функциональных” полиморфизмов в гене MAOA, ассоциированных с уровнем экспрессии и активностью фермента. Например, 5'-вариабельное число tandemных повторов MAOA (VNTR) — последовательность ДНК из 30 пар оснований с 2, 3, 3.5, 4 или 5 повторами отрезка ДНК в промоторной области MAOA. Аллельный вариант MAOA-L (2, 3, 3.5 или 5 повторов), обуславливающий низкую активность моноаминоксидазы, связан с повышенным уровнем агрессивности [14] и склонностью к совершению насильственных преступлений [15, 16].

В патогенезе патологических зависимостей изучается также полиморфный локус rs1137070 гена MAOA — аллельный вариант С отвечает за повышенный риск развития табачной [17] и героиновой зависимости [18], в то время как аллель Т полиморфного варианта rs1137070 гена MAOA ассоциирован с агрессивным поведением на фоне интернет-зависимости, с зависимостью от онлайн-игр, а также с психическими расстройствами (шизофренией, депрессией) и др. [19]. Носители генотипа ТТ полиморфного локуса rs1137070 гена MAOA имеют низкую активность фермента MAOA [19, 20].

Ранее показано, что сочетания полиморфных вариантов генов нейромедиаторов имеют различные типы проявления в аспекте психологических особенностей личности [21–23]. Результаты обзора литературных источников свидетельствуют,

что лишь небольшая часть публикаций посвящена описанию связи между поведением детей и подростков с полиморфными вариантами гена rs1137070 *MAOA* [24]. Кроме этого, важно учитывать, что распространенность данного полиморфизма среди популяций мира имеет особенности: по данным ресурсов Ensembl и gnomAD (The Genome Aggregation Database), отражающих в том числе результаты масштабного проекта “1000 Genomes”, частота аллельного варианта *T* полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* выше у восточных (58%) и южных азиатов (61–65%) по сравнению с европеоидами – 29% [25, 26]. Россия – многонациональная страна, в частности в Ангаро-Енисейском макрорегионе проживают представители разных популяций. Ранее исследование частоты распространения полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* в макрорегионе не проводилось. Оценка ассоциации этого полиморфизма на паттерны поведения поможет продвинуться в понимании механизмов аддикций, в том числе это касается и ИЗ.

В связи с вышеперечисленным, целью настоящей работы было изучение распространенности частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* у русских, тувинских и хакасских подростков, степень их интернет-зависимости, оцененная по шкале Чена, а также анализ связи частот генотипов rs1137070 гена *MAOA* с наличием степени ИЗ-поведения в разных этнических группах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании было проведено тестирование по шкале Чена (модификация В.Л. Малыгина, 2011) [27] и генетическое тестирование 602 подростков 9–18 лет (средний возраст 14.6 лет, SD 1.7) в трех городах Центральной Сибири (Красноярск, $n = 255$; Кызыл, $n = 200$; Абакан, $n = 147$). На основании результатов тестирования подростки были разделены на группы: адаптивные интернет-пользователи (АИП) (27–42 балла по шкале Чена), неадаптивные интернет-пользователи (НИП) (43–64 балла) и патологические интернет-пользователи (ПИП) (≥ 65 баллов). Популяции включенных в исследование подростков согласно анкетным данным были определены как русские ($n = 329$), тувинцы ($n = 158$) и хакасы ($n = 72$). Для 43 человек популяционная принадлежность была определена как иная или не была указана, поэтому из сравнительного анализа распределения полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* между популяциями они были исключены.

Сбор материала для исследования и тестирования проводились в 13-ти общеобразовательных школах, классы для тестирования выбирались случайным образом. Каждый испытуемый был уведомлен о добровольности и анонимности ис-

следования. От подростков или их родителей (законных представителей) получены информированные согласия. Образцы слюны для генотипирования собирали с использованием “Устройств для сбора и сохранения ДНК слюны” (Кат. № RU 49080, NorgenBiotek Corp., Canada). Геномную ДНК выделяли из образцов слюны с помощью набора “DIAtom DNA Prep” (кат. № D 1024 ИзоГен, Россия). Варианты полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием прибора “Rotor-Gene 6000” (Qiagen, Германия). Генотипирование проводили по технологии TaqMan с использованием зондов и праймеров (ДНК-синтез, Россия) и реакционной смеси (кат. № M-428, Синтол, Россия). Условия амплификации были следующими: 1 цикл – 95°C, 3 мин; 40 циклов – 95°C, 15 с, 58°C – 30 с (измерение флуоресценции), 72°C – 30 с.

Исследование одобрено этическим комитетом ФИЦ “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук” (протокол № 12 от 18.12.2018 г.).

Соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга было проверено с использованием χ^2 . Сравнение частоты аллелей и генотипов между группами проводили с помощью онлайн-калькулятора <https://medstatistic.ru/>. Статистически значимыми различия считали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе проведен сравнительный анализ частоты распространенности генотипов и аллелей в группах подростков, проживающих в Красноярске, Кызыле и Абакане (табл. 1). Распространенность гетерозиготного генотипа *СТ* полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* статистически значимо выше в группе красноярских подростков по сравнению с подростками из Кызыла и Абакана (39.6 против 30.5 и 27.9% соответственно). Встречаемость гомозиготного генотипа *ТТ* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* значимо выше в группе подростков из Кызыла и Абакана по сравнению с подростками Красноярска (28.0 и 27.9 против 18.4% соответственно).

В городах Ангаро-Енисейского региона проживает не только коренное население, но и пришлое. В связи с чем проведен анализ распространенности в группах подростков разных популяций (табл. 2). Отмечено, что в Абакане проживает больше русских, чем в Кызыле, т.е. в Тыве пришлого населения меньше. Частота гетерозиготного генотипа *СТ* полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* статистически значимо выше у русских подростков по сравнению с тувинскими подростками (35.6 против 25.9%). Встречаемость гомозиготного генотипа *ТТ* полиморфного варианта rs1137070

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* у подростков, проживающих в городах Ангаро-Енисейского макрорегиона, % (*n*)

Генотипы и аллели	Красноярск, <i>n</i> = 255 (1)	Кызыл, <i>n</i> = 200 (2)	Абакан, <i>n</i> = 147 (3)	<i>p</i> между изученными группами	χ^2 , d.f. = 1
<i>CC</i>	42.0 (107)	41.5 (83)	44.2 (65)	—	—
<i>CT</i>	39.6 (101)	30.5 (61)	27.9 (41)	1, 2 = 0.045 1, 3 = 0.018	1, 2 = 4.055 1, 3 = 5.603
<i>TT</i>	18.4 (47)	28.0 (56)	27.9 (41)	1, 2 = 0.016 1, 3 = 0.028	1, 2 = 5.860 1, 3 = 4.880
<i>C</i>	61.8 (315)	56.7 (227)	58.2 (171)	—	—
<i>T</i>	38.2 (195)	43.3 (173)	41.8 (123)	—	—

Примечание. Указаны только $p < 0.05$.

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* у подростков популяций Ангаро-Енисейского макрорегиона, % (*n*)

Частоты генотипов и аллелей, %	Русские, <i>n</i> = 329 (1)	Тувинцы, <i>n</i> = 158 (2)	Хакасы, <i>n</i> = 72 (3)	<i>p</i> между изученными группами	χ^2 , d.f. = 1
<i>CC</i>	43.2 (142)	43.0 (68)	45.9 (33)	—	—
<i>CT</i>	35.6 (117)	25.9 (41)	31.9 (23)	1, 2 = 0.034	1, 2 = 4.500
<i>TT</i>	21.2 (70)	31.1 (49)	22.2 (16)	1, 2 = 0.020	1, 2 = 5.480
<i>C</i>	60.9 (401)	56.0 (177)	61.8 (89)	—	—
<i>T</i>	39.1 (257)	44.0 (139)	38.2 (55)	—	—

Примечание. Указаны только $p < 0.05$.

гена *MAOA* значимо выше в группе тувинских подростков по сравнению с русскими (31.1 против 21.2%).

На основании результатов тестирования по шкале CIAS все исследуемые подростки были разделены на группы в зависимости от количества набранных баллов (АИП, НИП и ПИП). Было проведено сравнение распространения данных ИЗ-групп в зависимости от принадлежности к определенной популяции (табл. 3). Показано, что адаптивные пользователи интернета значимо чаще встречаются среди русских подростков по сравнению с тувинцами (52.6 против 39.2%). Обращает на себя внимание, что распространенность неадаптивных пользователей интернета, статистически значимо выше среди тувинских подростков по сравнению с русскими и хакасскими подростками (42.4 против 31.9 и 23.6% соответственно). Выявленная по результатам тестирования патологическая интернет-зависимость чаще наблюдается среди хакасов по сравнению с остальными исследованными группами подростков, по сравнению с русскими различия являются статистически значимы (26.4 против 15.5%).

Следующим этапом работы был анализ распространенности разной степени интернет-зависимости у подростков популяций Ангаро-Енисейского макрорегиона в зависимости от наличия того или иного генотипа полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA*. Сравнительный анализ у носителей генотипов *CC*, *CT*, *TT* полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* проводился как внутри каждой из трех популяций в зависимости от степени ИЗ (АИП, НИП, ПИП), так и между популяциями (АИП-АИП, НИП-НИП, ПИП-ПИП) (табл. 4, рис. 1). Генотип *CC* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* у неадаптивных пользователей интернета среди тувинских подростков встречается значимо реже по сравнению с ПИП и АИП (9.7 против 12.5% ($p = 0.031$, $\chi^2 = 4.661$) и 11.5% ($p = 0.004$, $\chi^2 = 8.785$)). Наблюдается статистически значимое различие в частоте встречаемости генотипа *TT* полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* между русскими и тувинскими подростками среди неадаптивных пользователей интернета, являющихся носителями генотипа *TT* (12.1 и 12.6%, $p = 0.036$, $\chi^2 = 2.172$).

Таблица 3. Распространенность разной степени интернет-зависимости по шкале CIAS у подростков популяций Ангаро-Енисейского макрорегиона % (*n*)

Группа ИЗ по шкале CIAS	Русские, <i>n</i> = 329 (1)	Тувинцы, <i>n</i> = 158 (2)	Хакасы, <i>n</i> = 72 (3)	<i>p</i> между изученными группами	χ^2 , d.f. = 1
АИП	52.6 (173)	39.2 (62)	50.0 (36)	1, 2 = 0.006	1, 2 = 7.611
НИП	31.9 (105)	42.4 (67)	23.6 (17)	1, 2 = 0.024 2, 3 = 0.007	1, 2 = 5.142 2, 3 = 7.536
ПИП	15.5 (51)	18.4 (29)	26.4 (19)	1, 3 = 0.028	1, 3 = 4.860

Примечание. Указаны только $p < 0.05$.

Таблица 4. Распространенность разной степени интернет-зависимости по шкале CIAS у подростков популяций Ангаро-Енисейского макрорегиона в зависимости от генотипа полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA*, % (*n*)

Генотип rs1137070 <i>MAOA</i>	Русские, <i>n</i> = 329			Тувинцы, <i>n</i> = 158			Хакасы, <i>n</i> = 72			<i>p</i> между изученными группами	χ^2 , d.f. = 1
	АИП (1)	НИП (2)	ПИП (3)	АИП (4)	НИП (5)	ПИП (6)	АИП (7)	НИП (8)	ПИП (9)		
<i>CC</i>	29.1 (76)	20.9 (43)	16.0 (23)	11.5 (30)	9.7 (20)	12.5 (18)	7.3 (19)	2.9 (6)	5.6 (8)	4, 5 = 0.031 5, 6 = 0.004	4, 5 = 4.661 5, 6 = 8.785
<i>CT</i>	35.3 (61)	18.0 (37)	13.2 (19)	24.2 (15)	10.2 (21)	3.5 (5)	27.8 (10)	3.4 (7)	4.2 (6)	–	–
<i>TT</i>	20.8 (36)	12.1 (25)	6.3 (9)	27.4 (17)	12.6 (26)	4.2 (6)	19.4 (7)	1.9 (4)	3.5 (5)	2, 5 = 0.036	2, 5 = 2.172

Примечание. Указаны только $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Интернет-зависимость является мультифакториальным расстройством поведения и может объясняться взаимодействием генетически опосредованного функционирования нейромедиаторной системы, в основном серотонинергической и дофаминергической, с факторами окружающей среды, куда входят в том числе социальное окружение и бытовые особенности. За счет катализирования реакции окислительного дезаминирования нейромедиаторов *MAOA* регулирует уровень возбуждения нейронов в головном мозге. Генетически детерминированные повышенные или пониженные уровни данного фермента могут оказывать влияние на поведение человека. По данным исследователей, полиморфные варианты rs1137070 гена *MAOA* ассоциированы с изменением настроения, имеют гендерные отличия и зависят от факторов окружающей среды [13].

По результатам настоящей работы показано, что у подростков, проживающих в городах Абакан и Кызыл распространены генотипа *TT* полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* значимо выше, чем у красноярцев. Ранее указывалось на ассоциацию аллельного варианта *T* и генотипа *TT* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA* с низкой активностью *MAOA*, тогда как аллель *C* обуславливает повышенную экспрессию ге-

на [28]. В городах Ангаро-Енисейского макрорегиона проживает как коренное, так и пришлое население. В ходе анализа показано, что в Хакасии пришлого населения больше, чем в Тыве. Генотип *TT* полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* значимо чаще встречается у тувинских подростков по сравнению с русскими. Важно отметить, что повышенная частота встречаемости генотипа *TT* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA*, ассоциированного с импульсивным поведением, наблюдается в азиатских популяциях мира [25], а хакасы и тувинцы относятся к тюркоязычным народам, ядро формирования которых исторически происходило на территории Монголии и Южной Сибири.

В результате проведенного тестирования по шкале Чена, которая показывает степень зависимости от интернета, нами выявлено, что среди хакасских и тувинских подростков более распространены неадаптивные и патологические пользователи интернета. Таким образом, по данным этого и других исследований, представители азиатских популяций, к которым имеют отношение популяции тувинцев и хакасов, более подвержены развитию патологических зависимостей, чем другие популяции [29–31].

В результате сравнительного анализа носителей генотипов *CC*, *CT*, *TT* полиморфного вариан-

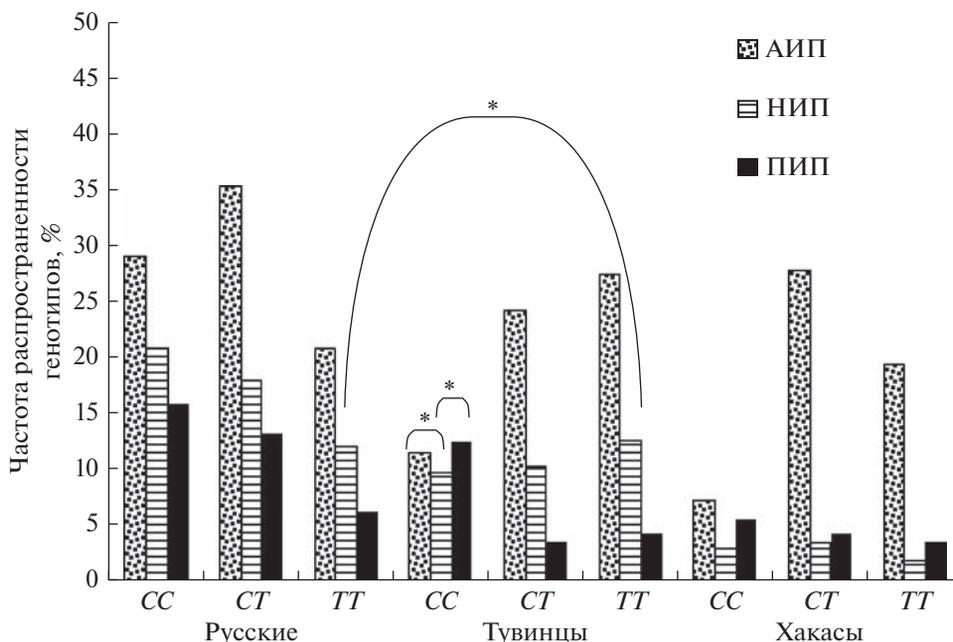


Рис. 1. Распространенность разной степени интернет-зависимости по шкале CIAS у подростков популяций Ангаро-Енисейского макрорегиона в зависимости от генотипа полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA*, %; * – значения $p < 0.05$.

та rs1137070 гена *MAOA* как внутри каждой из трех популяций Ангаро-Енисейского макрорегиона в зависимости от степени ИЗ, так и между популяциями, выявлено, что среди тувинских подростков генотип *CC* полиморфного локуса rs1137070 гена *MAOA* у неадаптивных пользователей интернета встречается реже по сравнению с адаптивными пользователями и подростками, имеющими патологическую ИЗ. Обращает на себя внимание, что частота генотипов *CT* и *TT* полиморфного варианта rs1137070 гена *MAOA*, которые имеют хотя бы один “патологический” аллельный вариант *T* (ассоциированный с агрессией и игровой зависимостью [19, 20]), у русских и тувинских подростков выше как у адаптивных, так и у неадаптивных интернет-пользователей. Такая тенденция в распределении частот потенциально обусловлена этническими особенностями и требует дальнейшего изучения при увеличении выборок. Кроме того, существует вероятность, что к 18 годам патологическая интернет-зависимость еще не проявилась фенотипически, однако влияние сопутствующих факторов окружающей среды в целом может этому способствовать, в связи с чем требуется проведение профилактических мероприятий начиная с младшего школьного возраста, чтобы этому препятствовать.

Необходимо отметить, что настоящая работа является пилотной в изучении полиморфизма гена моноаминоксидазы А (rs1137070 *MAOA*) в популяциях Ангаро-Енисейского макрорегиона. Полученные нами тенденции в распространенности

генотипов этого гена, имеющих “патологический” аллель *T*, интересны как для популяционной генетики, так и для формирования потенциального контента генетических маркеров развития патологических зависимостей.

В не очень отдаленном будущем результаты данного и подобных исследований позволят выйти на поиск новых терапевтических мишеней и путей ранней профилактики патологических зависимостей с оценкой степени генетического риска их развития. Критически важно, чтобы профилактические вмешательства со стороны здравоохранения, образования и семейного института проводились на ранних стадиях ИЗ, еще до наступления аддикций.

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.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mboya I.B., Leyaro B.J., Kongo A. et al.* Internet addiction and associated factors among medical and allied

- health sciences students in northern Tanzania: A cross-sectional study // *BMC Psychol.* 2020. V. 8. № 73. <https://doi.org/10.1186/s40359-020-00439-9>
2. Casale S., Fioravanti G. Internet addiction: Theoretical models, assessment and intervention // *OUP.* 2023. V. 1. P. 351–360. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818872-9.00143-6>
 3. Paik A., Oh D., Kim D. A case of withdrawal psychosis from internet addiction disorder // *Psychiatry Investigation.* 2014. V. 2. № 11. P. 207–209. <https://doi.org/10.4306/pi.2014.11.2.207>
 4. Young K.S. Psychology of computer use: XL. Addictive use of the Internet: A case that breaks the stereotype // *Psychol. Rep.* 1996. V. 79. P. 899–902. <https://doi.org/10.2466/pr0.1996.79.3.899>
 5. Young K.S. Internet addiction: The emergence of a new clinical disorder // *Cyberpsychol. Behav.* 1998. V. 1. P. 237–244. <https://doi.org/10.1089/cpb.1998.1.237>
 6. Mak K.-K., Lai C.-M., Ko C.-H. et al. Psychometric properties of the revised chen internet addiction scale (CIAS-R) in Chinese adolescents // *J. Abnorm. Child Psychol.* 2014. V. 42. P. 1237–1245. <https://doi.org/10.1007/s10802-014-9851-3>
 7. Chia D.X.Y., Ng C.W.L., Kandasami G. et al. Prevalence of internet addiction and gaming disorders in southeast Asia: A meta-analysis // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020. V. 17. P. 2582. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072582>
 8. Ojeda D.A., Niño C.L., López-León S. et al. A functional polymorphism in the promoter region of *MAOA* gene is associated with daytime sleepiness in healthy subjects // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 337. P. 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.12.005>
 9. Shih J.C., Thompson R.F. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 65. P. 593–598. <https://doi.org/10.1086/302562>
 10. McGregor N.W., Hemmings S.M.J., Erdman L. et al. Modification of the association between early adversity and obsessive-compulsive disorder by polymorphisms in the *MAOA*, *MAOB* and *COMT* genes // *Psychiatry Res.* 2016. V. 246. P. 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.10.044>
 11. Shih J.C., Wu J.B., Chen K. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes // *J. Neural. Transm.* 2011. V. 118. P. 979–986. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0562-9>
 12. Naoi M., Maruyama W., Shamoto-Nagai M. Type A monoamine oxidase and serotonin are coordinately involved in depressive disorders: From neurotransmitter imbalance to impaired neurogenesis // *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2018. V. 125. № 1. P. 53–66. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1709-8>
 13. Liu Z., Huang L., Luo X.-J. et al. *MAOA* variants and genetic susceptibility to major psychiatric disorders // *Mol. Neurobiol.* 2016. V. 53. P. 4319–4327. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9374-0>
 14. McDermott R., Tingley D., Cowden J. et al. Monoamine oxidase A gene (*MAOA*) predicts behavioral aggression following provocation // *Proc. Natl Acad. Sci.* 2009. V. 106. P. 2118–2123. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808376106>
 15. Ferguson C.J. Genetic contributions to antisocial personality and behavior: A meta-analytic review from an evolutionary perspective // *J. Soc. Psychol.* 2010. V. 150. P. 160–180. <https://doi.org/10.1080/00224540903366503>
 16. Sohrabi S. The criminal gene: the link between *MAOA* and aggression (review) // *BMC Proc.* 2015. V. 9. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S1-A49>
 17. Chiang S.-L., Nithiyanantham S., Velmurugan B.K., Tu H.-P. et al. A haplotype-specific linkage disequilibrium pattern of monoamine oxidase A gene associated with regular smoking in women // *J. Gene Med.* 2019. V. 21. <https://doi.org/10.1002/jgm.3142>
 18. Sun Y., Liu L., Feng J., Yue W. et al. *MAOA* rs1137070 and heroin addiction interactively alter gray matter volume of the salience network // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. <https://doi.org/10.1038/srep45321>
 19. Yen J.-Y., Chou W.-P., Lin H.-C., Wu H.-C. et al. Roles of hostility and depression in the association between the *MAOA* gene polymorphism and internet gaming disorder // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021. V. 18. <https://doi.org/10.3390/ijerph18136910>
 20. Dorfman H.M., Meyer-Lindenberg A., Buckholtz J.W. Neurobiological mechanisms for impulsive-aggression: The role of *MAOA* // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2014. V. 17. P. 297–313. https://doi.org/10.1007/7854_2013_272
 21. Tereshchenko S.Yu., Kasparov E.V., Semenova N.B. et al. Generalized and specific problematic internet use in central siberia adolescents: A school-based study of prevalence, age–sex depending content structure, and comorbidity with psychosocial problems // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022. V. 19. <https://doi.org/10.3390/ijerph19137593>
 22. Терещенко С.Ю., Смольникова М.В. Нейробиологические факторы риска формирования интернет-зависимости у подростков: актуальные гипотезы и ближайшие перспективы // *Соц. психология и общество.* 2020. Т. 11. С. 55–71. <https://doi.org/10.17759/sps.2020110104>
 23. Zmorzyński S., Styk W., Klinkosz W., Iskra J., Filip A.A. Personality traits and polymorphisms of genes coding neurotransmitter receptors or transporters: review of single gene and genome-wide association studies // *Ann. Gen. Psychiatry.* 2021. V. 20. P. 7. <https://doi.org/10.1186/s12991-021-00328-4>
 24. Kolla N.J., Bortolato M. The role of monoamine oxidase A in the neurobiology of aggressive, antisocial, and violent behavior: A tale of mice and men // *Prog. Neurobiol.* 2020. V. 194. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101875>
 25. Ensembl – a genome browser for vertebrate genomes 2023. (дата обращения 20.04.2023). <https://www.ensembl.org/index.html>

26. Siwei C., Laurent C.F., Goodrich J.K. et al. A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes // *bioRxiv*. 2022. V. 3. <https://doi.org/10.1101/2022.03.20.485034>
27. Малыгин В.Л. Интернет-зависимое поведение. Критерии и методы диагностики. М.: МГМСУ, 2011. 33 с.
28. Tu H.P., Ko A.M.S., Wang S.J. et al. Monoamine oxidase A gene polymorphisms and enzyme activity associated with risk of gout in Taiwan aborigines // *Hum. Genet.* 2010. V. 127. P. 223–229. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0765-z>
29. Fong T.W. The vulnerable faces of pathological gambling // *Psychiatry Edgmont*. 2005. V. 2. P. 34–42.
30. Fong T.W., Tsuang J. Asian-Americans, addictions, and barriers to treatment // *Psychiatry Edgmont*. 2007. V. 4. P. 51–59.
31. Barry D.T., Steinberg M.A., Wu R., Potenza M.N. Differences in characteristics of Asian American and white problem gamblers calling a gambling helpline // *CNS Spectr.* 2009. V. 14. P. 83–91. <https://doi.org/10.1017/s1092852900000237>

Polymorphism of the *MAOA* Gene (rs1137070) and Internet Addiction in Adolescents

K. V. Kopylova^a, I. V. Marchenko^a, M. V. Shubina^a,
N. N. Gorbacheva^a, I. A. Novitckii^a, and M. V. Smolnikova^{a, *}

^aScientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center “Krasnoyarski Scientific Center Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: smarinv@yandex.ru

Monoamine oxidase A (MAOA) catalyzes the degradation of norepinephrine, dopamine, and serotonin, i.e. neurotransmitters involved in the pathogenesis of pathological addictions, including internet addiction (IA). Gene *MAOA* has been actively studied in terms of genetic predisposition to the development of aggressive behavior potentially involved in the formation of IA. The study included 602 adolescents (9–18 years old, mean age = 14.6, SD 1.7) from the Angara-Yenisei macroregion (Russians $n = 329$, Tuvans $n = 158$, Khakasses $n = 158$). The type of IA was assessed according to the Chen scale (Chen Internet Addiction Scale, CIAS), gene polymorphism was detected using real-time PCR. The distribution of the *TT* genotype of *MAOA* rs1137070 polymorphism associated with low activity of the monoamine oxidase A enzyme and aggressive behavior affected by IA, was found to be significantly higher in Tuvan adolescents compared with Russians (31.1/21.2% $p = 0.02$). Pathological internet addiction (more than 65 points by Chen scale) often observed among Khakass adolescents compared to Russian (26.4/15.5%, $p = 0.03$). Thus, the allelic variant *T* of *MAOA* rs1137070 polymorphism appears to be potential marker for dependent and aggressive behavior to form, Asian representatives being more susceptible to the development of pathological addictions than Caucasian populations.

Keywords: monoamine oxidase, *MAOA*, polymorphism, Internet addiction, adolescents, populations.