

Том 60, Номер 9

ISSN 0016-6758

Сентябрь 2024



# ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 60, номер 9, 2024

---

## Обзорные и теоретические статьи

Комментарий. Еще одна нерешаемая проблема и аксиома биологии: нельзя из свойств отдельных составляющих клеток вывести их свойства в организме

Л. Г. Кондратьева, Е. Д. Свердлов

3

---

## Общая генетика

Нематода *Caenorhabditis elegans* как объект для тестирования генотоксичности химических соединений

С. К. Абилов, Э. М. Мачигов, С. В. Смирнова, М. В. Марсова

10

---

## Молекулярная генетика

Комбинирование гистологического и транскриптомного подходов для аннотации клеточных типов немодельных организмов на примере иглистых мышей *Acomys cahirinus*

Н. С. Филатов, А. И. Билялов, Г. Р. Газизова, А. А. Билялова, Е. И. Шагимарданова,  
М. В. Воронцова, А. П. Киясов, О. А. Гусев, О. С. Козлова

16

---

## Генетика микроорганизмов

Новый инсерционный элемент в гене *ToxA* гриба *Pyrenophora tritici-repentis*

Н. В. Мироненко, А. С. Орина, Н. М. Коваленко

25

---

## Генетика растений

Вариабельность транзитного пептида фитоинсинтазы ZmPSY1 связана с белой окраской эндосперма зерна у инбредных линий кукурузы

Д. Х. Архестова, А. Д. Хаудов, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева

32

Генетическая оценка *Juniperus communis* var. *oblonga* Hort. ex Loudon. в Кавказском регионе России, основанная на nSSR-маркерах

Е. В. Хантемирова

41

---

## Генетика животных

Гаплотипическое разнообразие беляночки *Leptidea morsei* (Fenton, 1882) (Lepidoptera, Pieridae) на северо-западной периферии ареала

О. И. Кулакова, Д. М. Шадрин, А. Г. Татаринов

54

---

## Генетика человека

- Полиморфные варианты генов длинных некодирующих РНК в развитии сахарного диабета 2-го типа  
*О. В. Кочетова, Д. Ш. Авзалетдинова, Т. М. Кочетова, Т. В. Викторова, Г. Ф. Корытина* 63
- Ассоциация полиморфных локусов генов длинных некодирующих РНК  
(*H19, MEG3, MALAT1, LINC00305, LINC00261, LINC02227 и CDKN2B-AS1*)  
с хронической обструктивной болезнью легких  
*Г. Ф. Корытина, Л. З. Ахмадишина, В. А. Маркелов, Т. Р. Насибуллин, Ю. Г. Азнабаева,  
О. В. Кочетова, Н. Н. Хуснутдинова, А. П. Ларкина, Н. Ш. Загидуллин, Т. В. Викторова* 74
- Изменение популяционной структуры населения Курской и Воронежской губерний  
в первой половине XX в. Изоляция расстоянием Малеко  
*К. Н. Сергеева, С. Н. Соколов, Ю. И. Гончарова, А. С. Невинных, И. В. Батлуцкая, И. Н. Сорокина* 90
- Динамика популяционной структуры населения Белгородской области.  
Изоляция расстоянием Малеко  
*К. Н. Сергеева, С. Н. Соколов, Ю. И. Гончарова, А. С. Невинных, И. В. Батлуцкая, И. Н. Сорокина* 98
- 

## Краткие сообщения

- Выявление новых филогенетических линий у восточноазиатской мыши на юге Сихотэ-Алиня на  
основе анализа изменчивости гена цитохрома *b*  
*В. Д. Цуканова, И. Н. Шереметьева* 110

УДК 57.017.22

## КОММЕНТАРИЙ. ЕЩЕ ОДНА НЕРЕШАЕМАЯ ПРОБЛЕМА И АКСИОМА БИОЛОГИИ: НЕЛЬЗЯ ИЗ СВОЙСТВ ОТДЕЛЬНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ КЛЕТОК ВЫВЕСТИ ИХ СВОЙСТВА В ОРГАНИЗМЕ

© 2024 г. Л. Г. Кондратьева<sup>1, 2, \*</sup>, Е. Д. Свердлов<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: liakondratyeva@yandex.ru

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

*“Книжные полки забиты томами, описывающими успехи разума и кремниевых чипов. Мы ожидаем, что наука скажет нам, что можно сделать, и что нужно сделать. Правительства надеются на ученых, что они улучшат качество жизни и защитят нас от прежних “улучшений”. Футурологи не видят предела человеческим исследованиям, а социологи не видят конца множеству проблем, которые они порождают. В размышлениях наших средств массовой информации о будущем науки преобладают ожидания великих вмешательств: взлома генетического кода человека, лечения всех наших болезней, манипулирования каждым атомом материальной вселенной и в конечном итоге создания интеллекта, превосходящего наш собственный. Человеческий прогресс все больше похож на гонку по манипулированию окружающим нас миром на всех уровнях”.*

John D. Barrow “Impossibility: The Limits of Science and the Science of Limits”, Oxford University Press, 1999

*“Технологии скачут впереди концепций. Мы отошли от изучения сложности организма; от процессов и организации к составным частям.”*

Джеймс Блэк — лауреат Нобелевской премии по медицине, 1988

Поступила в редакцию 13.02.2024 г.

После доработки 06.03.2024 г.

Принята к публикации 12.03.2024 г.

В рамках краткого комментария обсуждается проблема непредсказуемых (“эмерджентных”) свойств сложных биологических систем, возникающих в результате взаимодействий между их отдельными компонентами. Обращается внимание на принципиальную невозможность определения статуса клетки в составе организма на основании данных, полученных после ее отделения от многоклеточной системы. Кратко рассматриваются современное состояние исследований истории появления многоклеточности и той сложности, которую ее появление внесло в обсуждение эволюции жизни на Земле. Предлагается обобщение имеющихся данных в форме аксиомы, утверждающей, что в многоклеточных организмах на каждом уровне организации возникают свойства, непредсказуемые на основании свойств отдельных модулей и клеток. Нельзя из свойств отдельных составляющих клеток вывести их свойства в организме.

**Ключевые слова:** сложные биологические системы, эмерджентные свойства, многоклеточность, межклеточные взаимодействия, аксиома сложности.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090017 **EDN:** AFBXCH

К написанию этого комментария побудили попытки (весьма активные) ученых установить свойства клеток в составе многоклеточного организма, используя блестящую технологию “Single-cell-sequencing” (секвенирование единичных клеток).

Таких работ очень много, упомянем несколько недавних [1–3]. “Мы полагаем, что вступили в эпоху науки, основанной на данных об отдельных клетках многоклеточных организмов” [4]. При этом нельзя сказать, что все ученые не понимают

теоретическую ущербность такой стратегии. Многие хорошо понимают: “Организация клеточных компартментов и макроструктур, а также межклеточных взаимодействий имеет фундаментальное значение для функционирования многоклеточных организмов. .... одноклеточные мультиомные методы требуют отделения клеток от их тканей и, *таким образом, приводят к потере информации о физических взаимодействиях внутри и между клетками, несмотря на ... усилия, предпринимаемые для учета (эффектов) межклеточных взаимодействий*” [1]; “Каждая клетка многоклеточного организма находится в постоянном взаимодействии со своим локальным микроокружением, которое содержит как клеточные, так и неклеточные компоненты, включая секретируемые факторы роста, внеклеточный матрикс, циркулирующие гормоны, питательные вещества и кислород. *Протоколы выделения клеток радикально нарушают клеточное микроокружение и основаны на сочетании механической диссоциации и длительной ферментативной обработки, часто при 37 °C. В свете этих фактов гипотеза о том, что сам процесс изоляции клетки из ее ниши значительно меняет профиль экспрессии ее генов, кажется разумной*” [5]. Характерно заключение этого последнего обзора: “... Целью этого обзора является предоставление дорожной карты по управлению искажениями в высокопроизводительных транскрипционных исследованиях. Далеко не идеальное, каждое экспериментальное вмешательство приносит свой собственный набор компромиссов, артефактов и осложнений. Поэтому необходим тщательный анализ преимуществ и рисков каждого метода для выбора для каждого проекта наиболее адаптированной процедуры, которая позволит получить наиболее точные карты транскрипции. *Этот обзор служит предостережением относительно интерпретации данных о клетках, изолированных из окружающей их среды in vivo. Что еще более важно, он направлен на содействие разработке более подходящих методов для точного определения состояний отделенных клеток в том виде, в котором они существуют в их естественном тканевом контексте, а также на создание транскрипционных атласов второго поколения*”.

Настоящий обзор является попыткой показать, что принципиально невозможно установить статус клетки в составе организма на основании данных, полученных после ее отделения от системы взаимодействующих партнеров; кроме того, он коснется нескольких связанных злободневных проблем. При этом мы полагаем целесообразным (хотя и необязательным в данном контексте) дать очень краткий скетч, касающийся исследований истории появления многоклеточности и той сложности, которую ее появление внесло в обсуждение эволюции жизни на Земле.

## ФЕНОМЕН МНОГОКЛЕТОЧНОСТИ: КЕМБРИЙСКИЙ ВЗРЫВ ИЛИ МНОГО РАНЬШЕ?

“Мультиклеточные эукариоты возрастом 1,63 млрд лет в формации Чуаньлингоу в Северном Китае” — статья с таким названием появилась 26 января 2024 г. в журнале “Science Advances” [6]. Практически одновременно в “Science” вышел популярный комментарий известной журналистки Элизабет Пенниси, работающей в этом журнале [7], он называется “Крошечные окаменелости перевернули хронологию многоклеточной жизни”. Остановимся на нем подробнее.

Это новое исследование, описывающее микроскопическую, похожую на водоросли окаменелость возрастом более 1,6 млрд лет, подтверждает идею о том, что одна из отличительных черт сложной жизни, которую мы видим вокруг нас, — многоклеточность — намного *старше*, чем считалось ранее. Вместе с другими недавними исследованиями находка окаменелости, о которой сообщается в Science Advances, предполагает, что линия (известная как эукариоты), которая состоит из клеток, разделенных на отдельные компартменты, стала многоклеточной примерно на 600 млн лет раньше, чем до сих пор полагали ученые.

Первыми на Земле появились *прокариоты* около 3,9 млрд лет назад; около 2 млрд лет назад появились гораздо более крупные одноклеточные — *эукариоты*, несущие ядра. На протяжении десятилетий исследователи считали, что эукариоты не образовывали многоклеточные структуры в течение одного миллиарда лет после их возникновения.

В 1989 г. исследователи описали *Qingshania magnifica* — микроскопическое ископаемое, которое, как они предположили, представляло собой примитивную зеленую водоросль, многоклеточный эукариот [8]. Никто не обратил особого внимания на это открытие, хотя оно произошло из формации Чуаньлингоу в Северном Китае, которая включает слои возрастом 1,6 млрд лет. Но с 2015 г. Маоянь Чжу (Maoyan Zhu) и Ланьюн Мiao (Lanyun Miao) — палеобиологи из Нанкинского института геологии и палеонтологии Китайской академии наук, не прекращали работу и в конечном итоге обнаружили 279 микроскопических окаменелостей, все из которых, кроме одного, принадлежат к *Q. magnifica*. В новой статье [6] они сообщают, что окаменелости состоят из цепочек до 20 цилиндрических клеток с прилегающими клеточными стенками, как у растений, видимыми под микроскопом в виде темных колец. У некоторых окаменелостей были споры с собственными клеточными стенками, что позволяет предположить, что нити имели специализированные репродуктивные структуры. Все указывает на то, что эукариоты к тому времени

были гораздо более разнообразными и сложными, чем предполагалось ранее.

Если простые, но разнообразные многоклеточные формы появились так рано, то для развития сложных многоклеточных форм потребовалось гораздо больше времени, чем думало большинство исследователей; первые существа с органами и клетками, не имевшими прямого доступа к внешней среде, появились менее одного млрд лет назад. “Если эти результаты подтвердятся, то они будут замечательными и преобразующими, хотя трудно сравнивать организм возрастом 1,6 млрд лет с существующими организмами” [7].

Проблеме Кембрийского взрыва посвящено огромное множество работ, трактующих его с разных точек зрения. Блестящий анализ ситуации в 2008 г. дал эколог Дж. Левинтон из Университета Стоуни-Брук, Нью-Йорк [9], в 2015 г. очень простой, но строгий анализ проблем опубликовал Д. Бриггс из Йельского университета [10]. Дж. Левинтон отметил, что внезапное появление огромного множества полнофункциональных форм жизни в слоях кембрийских горных пород не является результатом какого-либо известного эволюционного процесса, и признал, что принятое эволюционное время появления первой животной жизни сильно противоречит экстраполированным временам, полученным с помощью анализа “молекулярных часов”, основанного на предположении о примерном постоянстве скорости изменения последовательностей ДНК или белков между видами. Геологи-эволюционисты датировали кембрийские породы возрастом 542 млн лет назад. Что касается молекулярных часов: “Все основные исследования последовательно указывают на дату дивергенции [появления животной жизни]... значительно раньше начала кембрия” [9]. Оценки различий варьируют от 586 до более 1200 млн лет. Описанные выше данные китайских ученых сближают эти две категории данных.

Внезапное появление окаменелостей Кембрийского взрыва интересовало биологов со времен Ч. Дарвина. Дарвин высказывал мнение, что предковые формы “жили задолго до” первых ископаемых представителей, но не мог объяснить, почему нет окаменелостей этих более ранних форм. Он подчеркивал “бедность наших палеонтологических коллекций”, указывая, что “ни один полностью мягкий организм не может быть сохранен” [11]. К счастью, за последние 150 лет было обнаружено множество новых окаменелостей, позволяющих считать, что внезапное появление окаменелостей в кембрии (541–485 млн лет назад) вполне реально, а не является результатом несовершенной летописи окаменелостей [10].

Сложность возникших и проявившихся в Кембрийском взрыве систем порождает и такие

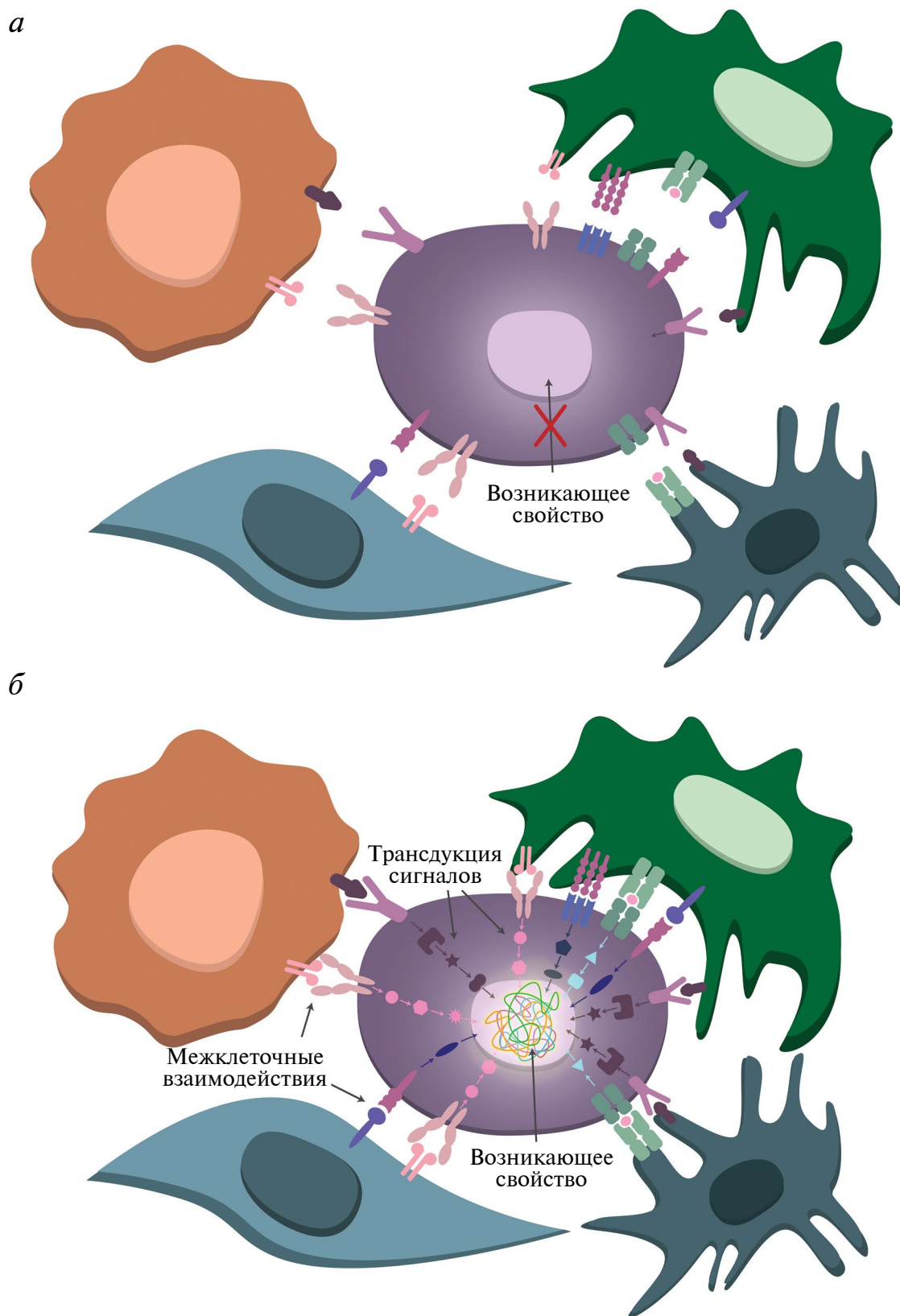
объяснения, как их космическое происхождение [12]. Нужно также упомянуть, что ученые-креационисты объясняют “внезапность” взрыва актом творения [13]. Модель сотворения в целом не испытывает потребности в “лучших доказательствах”. Тем не менее, кажущиеся простейшими, такие объяснения не так просты на самом деле, поскольку ставят вопрос о природе творца. В целом ясно, что перед учеными стоит сложнейшая задача найти наиболее рациональное объяснение величайшей эволюционной загадки: Кембрийского взрыва, приведшего к появлению предков большинства типов животных в летописи окаменелостей около 530 млн лет назад [14].

### ВОЗНИКАЮЩИЕ СВОЙСТВА. АКСИОМА СЛОЖНОСТИ

Вместе с многоклеточностью неизбежно появился эффект возникающих в результате межклеточных взаимодействий (“emergent”, эмерджентных) свойств. Они образуются всегда при взаимодействиях как молекул, так и клеток. Идея эмерджентных свойств давно дискутируется в философии и эволюционной биологии. Ей посвящены сотни публикаций и множество несогласующихся трактовок [15].

Свойства, возникающие в сложных системах в результате взаимодействия компонентов, непредсказуемы на основании свойств отдельных компонентов. Они так и называются — возникающие свойства (“emergent properties”), и не могут быть приписаны отдельным взаимодействующим субъектам — это свойства целой системы [16–19]. При этом система может состоять из иерархических уровней. Каждый из них имеет свои возникающие свойства, свойства нижнего уровня влияют на свойства следующего. На всех уровнях организации живых систем появляются возникающие свойства, а целый организм — это конечное возникающее свойство (рис. 1).

“Эмерджентные свойства” можно рассматривать как *непредсказуемое* поведение, возникающее в результате *взаимодействия* между компонентами системы и их средой. В результате система представляет собой нечто большее, чем просто сумму ее составных частей [15, 17, 20]. Идея эмерджентных свойств является старой в философии и науке, включая эволюционную биологию [21–23]. Детальная дискуссия потребовала бы обзора сотен публикаций и сопоставлений иногда противоположных точек зрения. Простейший парадигматический пример возникающего свойства: из свойств молекул водорода и кислорода невозможно предсказать все свойства воды — температуру ее кипения, поверхностное натяжение, свойство как растворителя, удельный вес, способность замерзать с образованием снежинок разнообразных форм и т. д. Это



**Рис. 1.** Возникающие свойства. *a* — не взаимодействующие клетки; *б* — взаимодействующие клетки порождают систему межклеточной сигнализации (стрелки) и непонятные возникающие свойства, условно обозначенные бесформенной разноцветной фигурой.

“фенотип” воды. Он возникает вследствие взаимодействия водорода и кислорода.

Сложность многоклеточных систем приводит к сложности трактовки их эволюции. В большой статье, вышедшей в журнале “Прогресс биофизики и молекулярной биологии” под названием “Неодарвинизм должен мутировать, чтобы выжить” [21], авторы, в частности, пишут: “Дарвиновская эволюция — это описательная концепция девятнадцатого века, которая сама по себе эволюционировала. Отбор путем выживания наиболее приспособленных был увлекательной идеей. Микроэволюция была биологически и эмпирически подтверждена открытием мутаций. ...отбор, основанный на выживании наиболее приспособленных, недостаточен для чего-либо, кроме микроэволюции”. Показано, что макроэволюция (необходимая для всех событий видообразования и усложнений, возникающих в результате Кембрийского взрыва) вероятностно крайне неправдоподобна (порядка  $10^{-50}$ ), если она основана на отборе путем выживания наиболее приспособленных”. Все проблемы трактовки макроэволюции упираются в сложности, связанные с возникающими признаками.

Сложность вносят не только те проблемы, о которых я сейчас говорил (то есть проблемы с определением строения клеток в составе многоклеточного организма), но и многие другие, стоящие перед исследователями. В общем виде мы сталкиваемся здесь с общеполитической проблемой, которую А. Эйнштейн формулировал так: “Невозможно решить проблему на том же уровне, на котором она возникла. Необходимо подняться на уровень выше” (“No problem can be solved from the same level of consciousness that created it. You have to rise above it to the next level.”), рис. 2 [24].

Эта формулировка согласуется со второй теоремой К. Гёделя о неполноте, которая показывает, что система не может продемонстрировать свою собственную непротиворечивость (“The system can not demonstrate its own consistency.”) [25]. Этот принцип неопределенности в применении к живым системам формулировал также Нильс Бор в замечательной книге “Атомная физика и человеческое познание” [26]: “...мы, без сомнения, убили бы животное, если бы попытались довести исследование его органов до того, чтобы можно было сказать, какую роль играют в его жизненных отправлениях отдельные атомы... Минимальная свобода, которую мы вынуждены предоставлять организму, как раз достаточна, чтобы позволить ему, так сказать, скрыть от нас свои последние тайны”.

Все это позволяет сформулировать биологическую аксиому:

*“В многоклеточных организмах на каждом уровне организации возникают свойства, непредсказуемые на основании свойств отдельных модулей и клеток.*

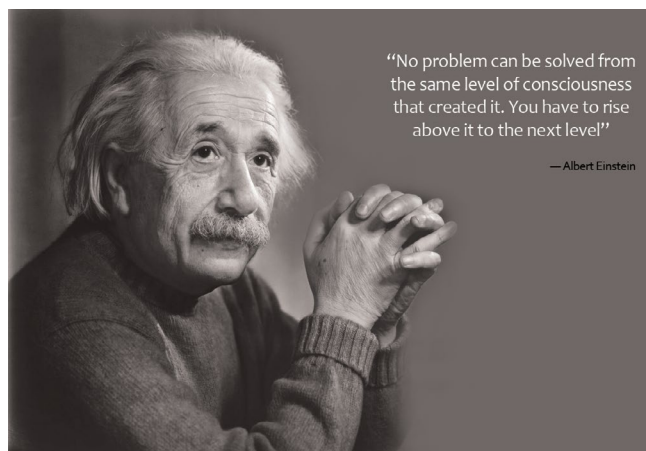


Рис. 2. А. Эйнштейн.

*Нельзя из свойств отдельных составляющих клеток вывести их свойства в организме”.*

Мы считаем, что возможным исключением является такое многоклеточное образование как раковая опухоль на поздних стадиях, когда множество клеток претерпевает эпителиально-мезенхимальный переход и межклеточные взаимодействия ослабевают.

Работа проведена в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

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. Baysoy A., Bai Z., Satija R., Fan R. The technological landscape and applications of single-cell multi-omics // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2023. V. № P. 1–19.
2. Raredon M.S.B., Yang J., Kothapalli N. et al. Comprehensive visualization of cell-cell interactions in single-cell and spatial transcriptomics with NICHES // Bioinformatics. 2022. V. 39. № 1. doi: 10.1093/bioinformatics/btac775
3. Liu Z., Sun D., Wang C. Evaluation of cell-cell interaction methods by integrating single-cell RNA sequencing data with spatial information // Genome Biology. 2022. V. 23. № 1. P. 218. doi: 10.1186/s13059-022-02783-y
4. Lahnemann D., Koster J., Szczurek E. et al. Eleven grand challenges in single-cell data science // Genome Biol. 2020. V. 21. № 1. P. 31. doi: 10.1186/s13059-020-1926-6

5. *Machado L., Relaix F., Mourikis P.* Stress relief: Emerging methods to mitigate dissociation-induced artefacts // *Trends Cell Biol.* 2021. V. 31. № 11. P. 888–897. doi: 10.1016/j.tcb.2021.05.004
6. *Miao L., Yin Z., Knoll A.H. et al.* 1.63-billion-year-old multicellular eukaryotes from the Chuanlinggou Formation in North China // *Sci. Adv.* 2024. V. 10. № 4. doi: 10.1126/sciadv.adk3208
7. *Pennisi E.* Tiny fossils upend timeline of multicellular life // *Science.* 2024. V. 383. № 6681. P. 352–353. doi: 10.1126/science.ado2396
8. *Yan Y.* Shale facies algal filaments from Chuanlinggou Formation in Jixian County // *Bull. Tianjin Inst. Geol. and Mineral Resources.* 1989. V. 21. № P. 149–165.
9. *Levinton J.S.* The Cambrian explosion: How do we use the evidence // *BioScience.* 2008. V. 58. № 9. P. 855–864.
10. *Briggs D.E.* The cambrian explosion // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. № 19. P. R864–R868. doi: 10.1016/j.cub.2015.04.047
11. *Darwin Ch.* On the origin of species // 1872. London: J. Murray, 502 p.
12. *Steele E.J., Al-Mufti S., Augustyn K.A. et al.* Cause of Cambrian explosion – terrestrial or cosmic? // *Progress in Biophys. and Mol. Biol.* 2018. V. 136. № P. 3–23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.004>
13. *Thomas B.* Cambrian clash: Fossils and molecular clocks disagree // *ICR News.* 2008. <https://www.icr.org/article/cambrian-clash-fossils-molecular-clocks-disagree>
14. *Lee M.S.Y., Dorey J.B.* Evolution: Dampening the Cambrian explosion // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. № 23. P. r1353–r1355. doi: 10.1016/j.cub.2018.10.012
15. *West-Eberhard M.J.* Modularity as a universal emergent property of biological traits // *J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol.* 2019. V. 332. № 8. P. 356–364. doi: 10.1002/jez.b.22913
16. *Heng H.H.* The conflict between complex systems and reductionism // *Jama.* 2008. V. 300. № 13. P. 1580–1581.
17. *Johnson C.W.* What are emergent properties and how do they affect the engineering of complex systems? // *Reliability Engineering & System Safety.* 2006. V. 91. № 12. P. 1475–1481.
18. *Korn R.* The emergence principle in biological hierarchies // *Biol. and Philosophy.* 2005. V. 20. № 1. P. 137–151.
19. *Suki B., Bates J.H., Frey U.* Complexity and emergent phenomena // *Compr. Physiol.* 2011. V. 1. № 2. P. 995–1029.
20. *Vicente F.N., Diz-Muñoz A.* Order from chaos: How mechanics shape epithelia and promote self-organization // *Curr. Op. in Syst. Biol.* 2023. V. 32–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2023.100446>
21. *Brown O.R., Hullender D.A.* Neo-darwinism must mutate to survive // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2022. V. 172. № P. 24–38. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.04.005
22. *Brown O.R., Hullender D.A.* Biological evolution requires an emergent, self-organizing principle // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2023. V. 182. P. 75–102. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2023.06.001
23. *Xavier da Silveira Dos Santos A., Liberali P.* From single cells to tissue self-organization // *Febs J.* 2019. V. 286. № 8. P. 1495–1513. doi: 10.1111/febs.14694
24. *Einstein A.* No problem can be solved from the same level of consciousness that created it. <https://www.azquotes.com/quote/87303> (accessed on 10-02-2024)
25. *Raatikainen P.* Gödel's incompleteness theorems // *Stanford Encyclopedia of Philosophy* (Winter 2013). <http://plato.stanford.edu/entries/goedel-incompleteness/>
26. *Бор Н.* Атомная физика и человеческое познание // 1961. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 152 с.

## Another Unsolvable Problem and Axiom of Biology: It is Impossible to Deduce the Properties of Cells in an Organism From the Properties of Individual Cells

L. G. Kondratyeva<sup>1,2, \*</sup>, E. D. Sverdlov<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>*National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia*

<sup>2</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

*\*e-mail: liakondratyeva@yandex.ru*

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

Within a brief commentary, the problem of unpredictable “emergent” properties of complex biological systems arising from interactions between their individual components is discussed. We draw attention to the fundamental impossibility of determining the state of the cell within the organism based on the data obtained after its separation from the multicellular system. Briefly considered are the current state of research on the history of the emergence of multicellularity and the complexity it has introduced into the discussion of the evolution of life on Earth. An axiom is proposed summarizing existing data, asserting that properties of multicellular organisms emerge at each level of organization that are unpredictable based on the properties of individual modules and cells. It is not possible to derive from the properties of individual cell components their properties in the whole organism.

**Keywords:** complex systems, emergent properties, multicellular organisms, cell–cell communication, axiom of complexity.

## НЕМАТОДА *Caenorhabditis elegans* КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2024 г. С. К. Абилов<sup>1</sup>\*, Э. М. Мачигов<sup>1</sup>, С. В. Смирнова<sup>1</sup>, М. В. Марсова<sup>1</sup>

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

\*e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

В связи с требованиями международных и национальных организаций к соблюдению принципов гуманизации экспериментов с использованием животных проводится поиск и апробация альтернативных тест-систем для замены животных в эколого-токсикологических и генотоксикологических исследованиях. Одной из таких альтернатив может быть нематода *Caenorhabditis elegans*, которая обладает системой биотрансформации химических соединений, аналогичной системе млекопитающих. Проведено изучение генотоксичности пестицида параквата и антибактериального средства фурацилина на *C. elegans* методом горизонтального гель-электрофореза тотальной ДНК с целью оценки ее целостности. Показано, что паракват в концентрациях 0,01 моль/л и фурацилин в концентрациях 0,0001 и 0,00025 моль/л индуцировали разрывы ДНК в клетках нематоды. Антиоксидант N-ацетилцистеин в концентрации 0,01 моль/л снижал генотоксичность обоих соединений.

**Ключевые слова:** *Caenorhabditis elegans*, разрывы ДНК, гель-электрофорез, паракват, фурацилин, N-ацетилцистеин.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090027 **EDN:** AFAVQL

В биомедицинских исследованиях основными модельными объектами являются лабораторные животные. С их помощью исследователи изучают функционирование организма как в норме, так и при развитии патологий, разрабатывают эффективные методы лечения и лекарственные препараты, моделируя болезни человека на релевантных животных тест-системах. Такое использование животных вызывает беспокойство в обществе, обращая внимание на этичность проводимых исследований из-за потенциальной возможности причинения боли и дистресса вовлеченным животным. В этой связи в 1959 г. была предложена концепция гуманного использования лабораторных животных в экспериментах, получившая название **3Rs**: Replacement (замена), Reduction (сокращение), Refinement (усовершенствование) [1].

«Замена» включает методы, позволяющие заменить использование животных тест-системами *in silico*, *invitro*, *ex vivo*, *in ovo* или *in vivo*, но с использованием животных более низкого филогенетического уровня и социальной значимости, например, беспозвоночных. «Сокращение» предполагает применение методов, позволяющих получить максимальный результат при использовании минимального (но достаточного) количества животных, например, совершенствованный дизайн

экспериментов, применение современных методов визуализации, обмен данными и ресурсами. «Усовершенствование» относится к процедурам, которые сводят к минимуму боль, страдание, дистресс или причинение длительного вреда животным путем обучения персонала, мониторинга состояния животных, применения анестезии и др.

Растет обеспокоенность по поводу ненадлежащего качества дизайна экспериментов и отсутствия прозрачной отчетности, которые способствуют частым неудачам доклинических исследований на животных в разработке методов лечения заболеваний человека. В 2010 г. были введены руководящие принципы «Исследования на животных: отчетность об экспериментах *in vivo*» (ARRIVE-Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), помогающие улучшить стандарты отчетности в этой области [2].

Для понимания степени внедрения этих принципов гуманизации экспериментов на животных в практику предклинических исследований был проведен анализ 3Rs-отчетности 500 доклинических исследований на животных за период с 2009 по 2018 гг. [3]. Только в двадцати одном исследовании было указано на соответствие руководящим принципам ARRIVE или аналогичным без раскрытия

деталей. Авторы данного анализа утверждают, что принципы **3Rs** в процедуры доклинических исследований внедряются крайне недостаточно и поэтому нужны другие стратегии их внедрения в практику доклинических исследований, например, образование, междисциплинарное сотрудничество и инициативы по финансированию **3Rs**.

В качестве замены животных в эколого-токсикологических и генотоксикологических исследованиях предложено использовать *Caenorhabditis elegans* для выяснения потенциальной токсичности и генотоксичности исследуемого фактора или химического соединения для млекопитающих [4, 5].

*Caenorhabditis elegans* — свободноживущая нематода размером около 1 мм в длину, предпочтительно обитающая в почве, богатой бактериями, которыми она питается. В лабораторных условиях она культивируется на плотной питательной среде с *E. coli* в качестве питательного субстрата. Ряд открытий, сделанных при помощи *C. elegans*, были удостоены трех Нобелевских премий: в 2002 г. за работы, посвященные генетической регуляции развития органов и программированной клеточной гибели, в 2006 г. за открытие РНК-интерференции — эффекта гашения активности определенных генов и в 2008 г. за работу по исследованию зеленого флуоресцентного белка (GFP) [5]. Геном нематоды был полностью секвенирован в 1998 г. [6]. Установлено, что 12 из 17 известных сигнальных путей, среди которых тирозинкиназный, серин-треониновый пути и другие, консервативны как у человека, так и у *C. elegans* [4].

Для генотоксикологических исследований “метод Комет” (Comet assay), который широко используется на мышах, был адаптирован для изучения повреждений ДНК в клетках генеративной линии *C. elegans* генотоксичными химическими соединениями [7]. Это связано с тем, что она является многоклеточным эукариотическим организмом и обладает системой биотрансформации химических соединений, аналогичной системе млекопитающих [8, 9]. Ранее нами было показано, что воздействие на *C. elegans* алкилирующим агентом бета-пропиолактоном (БПЛ) в диапазоне концентраций 0,00015–0,015 моль/л в течение 2 ч вызывает разрывы ДНК, начиная с концентрации 0,0015 моль/л. В свою очередь, антиоксидант N-ацетилцистеин (АЦЦ) снижал ДНК-повреждающую активность БПЛ в клетках нематоды [10].

Цель настоящей работы — изучение индукции паракватом и фурацилином разрывов ДНК в клетках *C. elegans* Bristol N2 и влияния антиоксиданта АЦЦ на уровень генотоксических воздействий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Химические препараты.** Все использованные химические вещества были аналитической чистоты. Паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорид) производства компании Sigma Aldrich (США), N-ацетилцистеин (АЦЦ) — компании Serva и фурацилин (семикарбазон 5-нитрофулфурола) фармакопейный — ОАО “Ирбитский химфармзавод”. Все необходимые разведения веществ готовили ex tempore.

**Культивирование нематод.** В работе использовали нематоду *C. elegans* Bristol N2, которую выращивали при 21 °С на твердой агарозной NGM-среде. В качестве питания использовали штамм *E. coli* OP50 в виде газона по описанному методу [11].

Для синхронизации поколения разросшуюся на чашке Петри популяцию нематод пипетировали в стерильной воде до получения взвеси нематод и яиц. Переносили 3,5 мл взвеси в пробирку и добавляли 1,5 мл свежеприготовленной смеси (0,5 мл 5M NaOH + 1 мл 5% HClO<sub>4</sub>). Перемешивали и вортиксовали 10 мин, затем центрифугировали 30 с при 1300g и удаляли супернатант. Затем промывали осадок, добавляя 5 мл воды, центрифугируя и удаляя супернатант, промывку повторяли три раза. Затем 0,1 мл суспензии яиц нематод переносили на чашку с NGM-агаром и газоном бактерий *E. coli* OP50. Выращивание синхронизированных нематод проводили при 21 °С в течение трех суток до достижения стадии L4 (“young adult”).

**Проведение эксперимента и выделение ДНК нематод.** Для проведения эксперимента червей смывали с чашек стерильной водой в 1,5 мл пробирки, осаждали на вортексе и сливали супернатант. К осадку добавляли паракват или фурацилин в разных концентрациях, пипетировали до образования взвеси и инкубировали 120 мин при 21 °С. Затем взвесью нематод центрифугировали 5 мин при 2300g и удаляли супернатант, добавляли 1 мл стерильной воды и пипетировали до получения взвеси. Далее нематод промывали 10 раз с целью освобождения кишечника червей от бактерий по ранее описанному методу [7, 11]. При последней промывке избыток воды удаляли, оставляя 1 мл смеси вода/нематоды, затем переносили в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 12100g в течение 10 мин. Супернатант сливали, а гранулу подвергали заморозке при –20 °С, после чего механически измельчали палочкой с абразивной поверхностью наконечника. Далее выделение ДНК проводили с использованием специального набора реагентов по протоколу Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Все этапы выделения ДНК нематод для электрофореза подробно описаны [10, 11]. Для электрофореза 1%-ный агарозный гель (0,01% бромид этидия) помещали в камеру с 10%-ным ТВЕ-буфером и

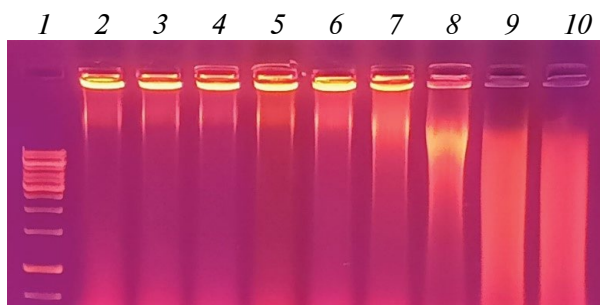
переносили в лунки геля по 20 мкл выделенной ДНК нематоды. Электрофорез проводили при 100 мА, 120 В, 80 Вт. Визуализацию результатов электрофореза ДНК нематоды осуществляли с помощью трансиллюминатора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

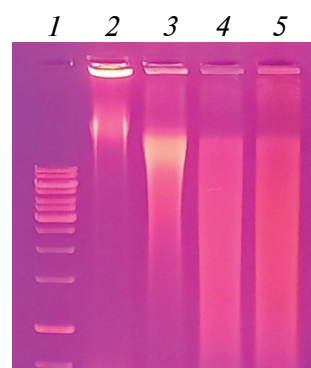
Паракват, четвертичный азотный гербицид, является высокотоксичным соединением для людей и животных, за последние несколько десятилетий было зарегистрировано много случаев острого отравления им и смерти. Основной причиной смерти при отравлении паракватом является дыхательная недостаточность из-за окислительного повреждения альвеолярного эпителия с последующим облитерирующим фиброзом [12]. При накоплении в клетках паракват подвергается NADPH-зависимому одноэлектронному восстановлению с образованием свободного радикала, который почти мгновенно вступает в реакцию с молекулярным кислородом, преобразуя катион и одновременно образуя супероксид-анион радикал. Дальнейшее восстановление супероксида в конечном итоге приводит к образованию наиболее реакционноспособного гидроксильного радикала, способного повреждать жизненно важные клеточные компоненты [13, 14].

В наших экспериментах (рис. 1) паракват индуцировал разрывы ДНК в клетках *C. elegans* при 90 мин воздействия в концентрациях 0,01, 0,025 и 0,05 моль/л (дорожки 7–9). В качестве позитивного контроля была использована перекись водорода (дорожка 10), вызывающая однонитевые разрывы в ДНК.

Паракват при низких концентрациях 0,0005, 0,001, 0,0025 и 0,005 моль/л не показал заметного влияния на целостность генетического материала нематоды, тогда как увеличение его концентрации от 0,01 до 0,05 моль/л последовательно усиливало картину фрагментации ДНК, что проявлялось в увеличении пути, пройденного фрагментированным генетическим материалом. Перекись водорода, использованная в качестве позитивного контроля в концентрации 0,1 моль/л, вызывала разрывы ДНК в наибольшей степени. Токсичность и генотоксичность параквата связана с генерацией им активных форм кислорода в клетках в результате циклического окисления и восстановления [14, 15]. В настоящее время не существует фармакологических антагонистов параквата и хелатирующих агентов, способных связывать его в крови или в других тканях. Поэтому лечение отравления паракватом до сих пор остается в основном поддерживающим и направлено на ослабление его токсических эффектов с помощью антиоксидантов [12]. В нашей работе антиоксидант АЦЦ снижал количество разрывов ДНК нематоды, вызываемых паракватом в концентрации 0,05 моль/л (рис. 2).



**Рис. 1.** Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию параквата в разных концентрациях (моль/л). 1 – маркер, 2 – вода (контроль), 3 – 0,0005, 4 – 0,001, 5 – 0,0025, 6 – 0,005, 7 – 0,01, 8 – 0,025, 9 – 0,05, 10 – перекись водорода 0,1 моль/л (положительный контроль).



**Рис. 2.** Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию параквата в концентрации 0,05 и АЦЦ в концентрациях 0,01 и 0,001 моль/л: 1 – маркер, 2 – вода (отрицательный контроль), 3 – паракват 0,05 + АЦЦ 0,01, 4 – паракват 0,05 + АЦЦ 0,001, 5 – паракват 0,05 моль/л.

Фурацилин – антисептическое средство, действующим веществом которого является нитрофура-  
л, относящийся к группе нитрофуранов. Проти-  
вомикробными свойствами обладают только сое-  
динения, содержащие нитрогруппу ( $\text{NO}_2$ ) строго  
в пятом положении фуранового цикла. Активный  
фрагмент представляет собой 5-нитро-2-фурил,  
который восстанавливается бактериальными ни-  
троредуктазами с образованием гидроксиламинового  
соединения [16]. Последнее в результате ряда фер-  
ментативных реакций образует супероксид-анион  
радикал, являющийся начальным звеном образо-  
вания в клетке других свободных радикалов, спо-  
собных легко реагировать с клеточными макромо-  
лекулами. В результате нарушается процесс клеточ-  
ного дыхания бактерий и биосинтез нуклеиновых  
кислот. Нитрофурановые соединения проявляют

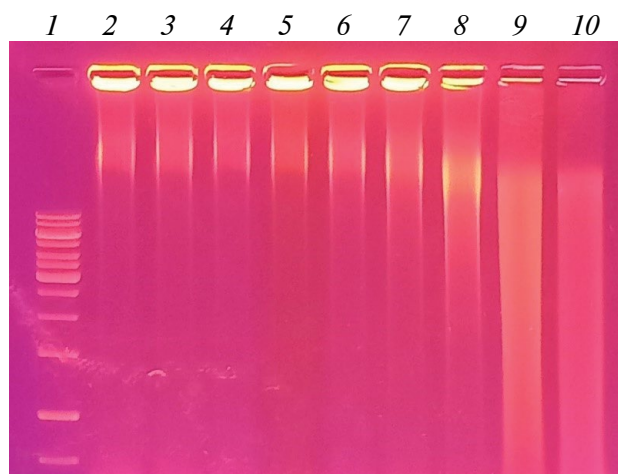
мутагенную активность на бактериях в тесте Эймса *Salmonella*/микросомы и в клеточных культурах млекопитающих и человека *in vitro* [17].

Процесс биотрансформации нитрофуранов в клетках млекопитающих начинается с восстановления нитрогруппы различными ферментными системами, включающими нитроредуктазы, ксантиноксидазу, НАДФН-цитохром 450-редуктазу и другие. В процессе биотрансформации нитрофуранов образуется широкий спектр высокореакционно-способных соединений: супероксид-анион, нитрильный и гидроксильный радикалы, а также электрофильные соединения, способные образовывать аддукты с ДНК [18]. Это означает, что нитрофураны могут проявлять генотоксичность как путем генерации свободных радикалов, способных вызывать разрывы нитей ДНК, так и образованием аддуктов с ДНК, приводящих к блокировке репликации ДНК.

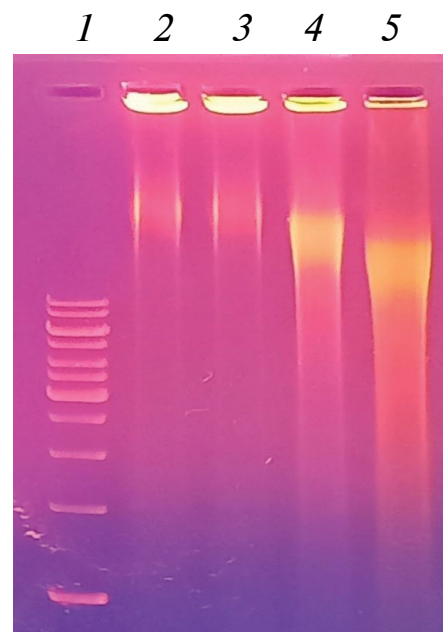
В наших экспериментах фурацилин индуцировал разрывы ДНК в клетках *C. elegans* в концентрациях 0,0001 и 0,00025 моль/л (рис. 3). При проведении экспериментов в качестве позитивного контроля использовали два вещества: бета-пропиолактон (БПЛ) и перекись водорода в концентрациях 0,015 и 0,1 моль/л соответственно. Выбор двух веществ для позитивного контроля был обусловлен тем, что фурацилин после восстановления нитроредуктазой образует гидроксиламиновое производное, которое впоследствии образует аддукт с ДНК [16], что может привести к образованию крупных фрагментов ДНК. С другой стороны, при многоступенчатой биотрансформации фурацилина образуются такие окислительные соединения, как супероксид-анион радикал и пероксид водорода, которые могут индуцировать разрывы ДНК. В случае перекиси водорода в ДНК образуются одонитевые разрывы, приводящие к мелким фрагментам.

Антиоксидант АЦЦ в концентрациях 0,001 и 0,01 моль/л снижал уровень разрывов ДНК нематоды, вызванных фурацилином в концентрации 0,00025 моль/л. Наиболее эффективная защита от генотоксического воздействия фурацилина показана в концентрации АЦЦ 0,01 моль/л (рис. 4).

Таким образом, в настоящей работе впервые проведено изучение генотоксичности пестицида параквата и антибактериального средства фурацилина на нематоде *C. elegans*. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что *C. elegans* может быть с успехом использована для первичной оценки генотоксичности химических соединений вместо мышей. Данный метод позволяет также изучать влияние антиоксидантов на генотоксичность исследуемого соединения. Для более эффективной работы в области генетической токсикологии необходимы тест-системы, которые бы сочетали в себе простоту в применении, дешевизну



**Рис. 3.** Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию фурацилина в разных концентрациях (моль/л): 1 – маркер, 2 – вода (контроль), 3 – 0,000005, 4 – 0,00001, 5 – 0,00002, 6 – 0,00005, 7 – 0,0001, 8 – 0,00025; положительные контроли: 9 – БПЛ 0,015 моль/л и 10 – перекись водорода 0,1 моль/л.



**Рис. 4.** Результаты гель-электрофореза генетического материала нематоды *C. elegans*, подвергнутой воздействию фурацилина в концентрации 0,00025 и АЦЦ в концентрациях 0,01 и 0,001 моль/л: 1 – маркер, 2 – вода (контроль), 3 – фурацилин 0,00025 + АЦЦ 0,01, 4 – фурацилин 0,00025 + АЦЦ 0,001, 5 – фурацилин 0,00025 моль/л.

ресурсов и быстроту в выполнении. *C. elegans*, как и все эукариоты, имеет в геноме большую группу генов системы детоксикации ксенобиотиков цитохром-Р450, исследование особенностей функционирования которых у *C. elegans* позволяет с некоторой степенью уверенности экстраполировать на человека результаты опытов по генотоксичности на данном организме.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках исследований по Государственному заданию 122022600163-7.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Russell, W.M.S., Burch, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, 1959. London: Reprinted by UFAW, 1002: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England. ISBN 0 900767 78 2.
2. Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C. et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research // PLoS Biol. 2010. V. 8. DOI:10.1371/journal.pbio.1000412
3. Kousholt B.S., Præstegaard K.F., Stone J.C. et al. Reporting of 3Rs approaches in preclinical animal experimental studies. A nationwide study // Animals (Basel). 2023. V13(19). DOI: 10.3390/ani13193005
4. Leung M.C.K., Williams F.L., Benedetto A. et al. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology // Toxicol. Sci. 2008. V. 106. P. 5–28. DOI:10.1093/toxsci/kfn121
5. Мишулина Р.Т., Фахруллин Р.Ф., Ишмухаметова Д.Г. *Caenorhabditis elegans* в токсикологии и нанотоксикологии // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. 2012. № 2. С. 172–282.
6. Consortium (The *C. elegans* Sequencing Consortium) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology // Science. 1998. V. 282. P. 2012–2018.
7. Imanikia S., Galea F., Nagy E. et al. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2016. V. 7(45) P. 356–361. DOI:10.1016/j.etap
8. Hartman J.H., Widmayer S.J., Christina M. et al. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans* // J. Toxicol. Envir. Health. 2021. Part B. V. 24(2). P. 51–94. DOI:10.1080/10937404.2021.1884921
9. Harlow P.H., Perry S.J., Alexander J. et al. Comparative metabolism of xenobiotic chemicals by cytochrome P450s in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Nat. Sci. Reports. 2018. V. 8. P. 13333. DOI: 10.1038/s41598-018-31215-w
10. Мачигов Э.А., Абилев С.К., Игонина Е.В., Марсова М.В. Изучение генотоксичности бета-пропиолактона с помощью lux-биосенсоров *E. coli* и нематоды *Caenorhabditis elegans* // Генетика. 2023. Т. 59. № 5. С. 507–516. DOI: 10.31857/S0016675823040070
11. Meneely P.M., Dahlberg C.L., Rose J.K. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism // Curr. Prot. Ess. Lab. Techn. 2019. V. 19. DOI: 10.1002/cpet.35
12. Iyyadurai R., Mohan J., Jose A. et al. Paraquat poisoning management // Curr. Med. Issues. 2019. V. 17. P. 34–37. DOI: 10.4103/cmi.cmi\_29\_19
13. Bus J.S., Aust S.D., Gibson J.E. Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 58. P. 749–755.
14. Fukushima T., Tanaka K., Lim H. et al. Mechanism of cytotoxicity of paraquat // Environ. Health and Preven. Med. 2002. V. 7. P. 89–94.
15. Onur B., Çavuşoğlu K., Yalçın E. et al. Paraquat toxicity in different cell types of Swiss albino mice // Nat. Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 4818. DOI:10.1038/s41598-022-08961-z
16. Roldan M.D., Perez-Reinado E., Castillo F. et al. Reduction of polynitroaromatic compounds: The bacterial nitroreductases // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 38. P. 474–500. DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x
17. McCalla D.R. Mutagenicity of nitrofur derivatives: Review // Environ. Mutagenes. 1983. V.5. P. 745–765.
18. Anderson D. & Philips B.J. Nitrofurazone-genotoxicity studies in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* // Food. Chem. Toxicol. 1985. V. 23. P. 1091–1098.

## **Nematode *Caenorhabditis elegans* as an Object for Testing the Genotoxicity of Chemical Compounds**

**S. K. Abilev<sup>1,\*</sup>, E. M. Machigov<sup>1</sup>, S. V. Smirnova<sup>1</sup>, M. V. Marsova<sup>1</sup>**

*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*

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

In connection with the requirements of International and national organizations to comply with the principles of humanization of experiments using animals, alternative test systems are being searched and tested to replace animals in ecological, toxicological and genotoxicological studies. One such alternative may be the nematode *Caenorhabditis elegans*, which has a biotransformation system of chemical compounds similar to the mammalian system. The genotoxicity of the pesticides paraquat and the antibacterial agent furacilin was studied on *C. elegans* by horizontal gel electrophoresis of total DNA in order to assess its integrity. It has been shown that paraquat in concentrations of 0.01 to 0.05 mol/l and furacilin f in concentrations of 0.0001 and 0.00025 mol/l, caused DNA breaks in nematode cells. The antioxidant N-acetylcysteine at a concentration of 0.01 mol/l reduced the genotoxicity of both compounds.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*, DNA breaks, gelelectrophoresis, paraquat, furacilin, N-acetylcysteine.

# КОМБИНИРОВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО И ТРАНСКРИПТОМНОГО ПОДХОДОВ ДЛЯ АННОТАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ТИПОВ НЕМОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ ИГЛИСТЫХ МЫШЕЙ

## *Acomys cahirinus*

© 2024 г. Н. С. Филатов<sup>1</sup>, А. И. Билялов<sup>1, 2</sup>, Г. Р. Газизова<sup>1</sup>, А. А. Билялова<sup>1</sup>,  
Е. И. Шагимарданова<sup>1, 2</sup>, М. В. Воронцова<sup>3</sup>, А. П. Киясов<sup>1</sup>, О. А. Гусев<sup>1, 4, 5</sup>, О. С. Козлова<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

<sup>2</sup>Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, 111123 Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Медицинский факультет университета Джунтендо, Токио, 113-8421 Япония

<sup>5</sup>ООО «ЛИФТ центр», Москва, Сколково, 121205 Россия

\*e-mail: olga-sphinx@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.03.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 27.04.2024 г.

Хрящевая ткань у млекопитающих обладает низким потенциалом к восстановлению, как правило, место дефекта замещается соединительной тканью. Мышь *Acomys cahirinus* является одной из сравнительно новых моделей для изучения процессов регенерации тканей, в том числе эластического хряща ушной раковины. Для изучения молекулярно-генетических механизмов, ответственных за эти процессы, и получения базового представления о клеточном и тканевом составе интактной ушной раковины нами был выбран метод секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq). Данный метод позволяет не просто количественно определить уровень экспрессии генов в образце в целом, но и смоделировать кластеризацию клеток в зависимости от профилей экспрессии, оценив тем самым гетерогенность образца с точки зрения присутствия в нем конкретных клеточных популяций. Подобная аннотация клеточных типов, особенно в случае немодельных организмов, нуждается в поддержке со стороны классических морфологических исследований, позволяющих более детально идентифицировать клеточные популяции, например разделять кластеры клеток, сгруппированные по статистическому принципу (на основании схожих профилей экспрессии группы генов), на более мелкие субпопуляции. Цель работы – проведение аннотации всех клеточных типов интактной ушной раковины *Acomys cahirinus*, используя комбинацию транскриптомного подхода и классических методов гистологии. В результате исследования, основываясь на известных маркерных генах, а также сопоставляя генетические и морфологические данные, были проаннотированы 24 клеточных кластера.

**Ключевые слова:** секвенирование единичных клеток, *Acomys cahirinus*, аннотация клеточных типов, регенерация.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090033 **EDN:** AEZRHO

Иглистые мыши рода *Acomys* являются перспективными модельными организмами для исследования механизмов регенерации [1]. Они демонстрируют уникальные способности к восстановлению тканей после повреждения без образования рубца, отличающие их от всех известных млекопитающих [1].

В своей предыдущей работе мы с помощью морфологических методов охарактеризовали способность иглистых мышей восстанавливать ткани ушной раковины после повреждения, а также запускать процессы хондрогенеза, которые ведут к полной репарации эластического хряща [2].

Следующим этапом исследования является изучение молекулярно-генетических механизмов данного процесса. Для достижения этой цели необходимо максимально полно определить клеточные популяции ушной раковины с одновременной оценкой изменения экспрессии генов, участвующих в процессах воспаления, репарации и хондрогенеза, на уровне клеточных типов. Для детального описания процесса регенерации чрезвычайно важно достоверно определить биологическое происхождение каждого клеточного кластера – другими словами, провести аннотацию клеточных типов.

Для решения поставленной задачи мы применили метод секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq), преимуществом которого является количественное определение экспрессии генов на уровне индивидуальных клеток, а не измерение экспрессии генов в биологическом образце, содержащем миллионы клеток в совокупности, как это делается при массовом РНК-секвенировании [3]. Эта улучшенная детализация позволяет обнаруживать и идентифицировать различные популяции клеток в исследуемых тканях, а также оценить разнообразие клеточных типов и уровень экспрессии генов внутри каждого отдельного клеточного кластера.

Классическая гистология, в свою очередь, предоставляет дополнительную возможность изучить и оценить клеточный состав и морфологические особенности тканей, а также их пространственную организацию, или гистоархитектонику. Более того, данный морфологический метод исследования позволяет идентифицировать и анализировать отдельно взятые клетки, основываясь на их структурных особенностях, таких как форма, размер, взаиморасположение, а также реакции при использовании стандартных методик гистологического окрашивания. Таким образом, полученная с помощью гистологии и цитологии информация является ценной в контексте понимания клеточного и тканевого состава исследуемого биологического материала.

Несмотря на значительный вклад классических методов гистологии в понимание клеточного состава и морфологии тканей, технология секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) уникальна по своей возможности обнаруживать даже редкие и недифференцируемые клеточные популяции, а также отслеживать динамику клеточных процессов, используя в качестве дифференцирующего фактора комплексный анализ экспрессии генов. Недостатком классического, “линейного” метода scRNA-seq является отсутствие пространственной информации, что создает проблему при сопоставлении выявленных в результате секвенирования клеточных типов с их реальной морфологией. Эта проблема решается на следующей стадии развития технологии секвенирования РНК единичных клеток — с помощью пространственной транскриптомики.

Интеграция методов классической гистологии и анализа данных scRNA-seq представляет собой перспективный подход к решению задачи аннотации клеточных типов. Сопоставляя гистологическую картину с профилями экспрессии РНК клеточных кластеров, мы способны, с одной стороны, провести корректную идентификацию групп клеток, имеющих схожую экспрессию, с другой стороны, дополнить гистологическую картину новыми

клеточными фенотипами со своей специфической молекулярной сигнатурой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основной идеей будущего эксперимента является изучение возможностей и механизмов репаративного хондрогенеза путем травматизации ушной раковины: при помощи панч-биопсии и частичной ампутации.

В течение эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария в соответствии с ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами”, ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур”. В опыте использовались конвенционные животные. Эксперименты проводили в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”.

Экспериментальные процедуры были одобрены локальным этическим комитетом Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (выписка № 40 от 9 марта 2023 года).

Забор тканей для секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq), а также для гистологического анализа проводили путем полной ампутации ушной раковины в условиях общего наркоза с использованием “Zoletil 100” в расчете 7 мг на 1 кг массы тела. После хирургических процедур осуществлялась антисептическая обработка операционной раны. Для гистологического анализа полученные фрагменты фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на 0,2 М фосфатном буфере (рН = 7,4) в течение 24 ч. Гистологическая проводка, заливка и микротомия (толщина срезов 4 мкм) осуществлялись по стандартной методике. Препараты окрашивали обзорными красителями: гематоксилин и эозин (ЭргоПродакшн, Бיוвитрум, Россия) и по Маллори (ЭргоПродакшн, Бювитрум, Россия). Цифровые гистотопограммы получали при помощи сканера гистологических препаратов NanoZoomer S60 Digital slidescanner (Hamamatsu, Япония) и анализировали при помощи программы NDP.view2 (Hamamatsu).

### *Пробоподготовка и секвенирование единичных клеток*

Ушные раковины после забора материала измельчали в капле охлажденного на льду PBS 1X в течение 5 мин и гомогенизировали в смеси коллагеназы II 10 мг/мл, проназы 5 мг/мл и 0,4 мг/мл ДНКазы I с использованием программы

37\_multi\_E гомогенизатора gentleMACS. Полученную суспензию пропускали через клеточное сито 70 мкм, двукратно отмывали в PBS с добавлением 10% FBS, ресуспендировали в нем же и пропускали через клеточное сито 30 мкм. Клетки фиксировали в метаноле и впоследствии регидрировали по протоколу 10X Genomics. Из регидрированной суспензии выделяли ДНК-позитивные (Hoechst+) клетки с помощью проточного цитофлуориметра-сортера BD FACSAria III Cell Sorter, отсеивая дебрис по интенсивности сигнала FSC-A. Из полученной суспензии готовили библиотеки для секвенирования РНК единичных клеток с использованием набора Chromium Next GEM Single Cell 5' (10X Genomics) по стандартному протоколу. Полученные библиотеки секвенировали на платформе HiSeq2500 (Illumina). В результате секвенирования было получено 285 млн пар чтений в режиме 120 + 72 пн.

#### Биоинформатическая обработка результатов секвенирования

Чтения были закартированы на геном и аннотацию *A. cahirinus* [4] с использованием программы cellranger count (версия 7.1.0), запущенной с параметрами по умолчанию. В результате было детектировано 6484 клетки с медианным количеством генов 2628 и средним числом чтений около 44 тыс. на клетку. Общая доля закартированных на геном чтений составила порядка 82%.

Предварительная обработка данных осуществлялась при помощи функций пакетов DropletUtils [5] и Scrublet [6].

Дальнейшая обработка данных проводилась с использованием функций пакета Seurat [7]. В ходе предварительной фильтрации из рассмотрения были удалены гены, экспрессированные менее чем в трех разных клетках. Минимальный и максимальный пороги на количество молекул,

детектированных в клетке (nFeature\_RNA), составили 200 и 5000 соответственно; кроме того, клетка не должна была быть определена как дублет. В результате в финальный набор данных вошла информация об экспрессии генов в 5563 клетках.

Для визуализации клеток в двумерном пространстве (построения кластерограмм) использовался общепринятый в обработке результатов секвенирования единичных клеток подход к уменьшению размерности UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection). Нормировка экспрессии осуществлялась методом SCTransform по 5000 наиболее вариабельных генов; для линейного (RunPCA) и нелинейного (RunUMAP) уменьшения размерности и поиска соседей (FindNeighbors) было использовано 30 главных компонент. Кластеры клеток определялись с разрешением 0.7.

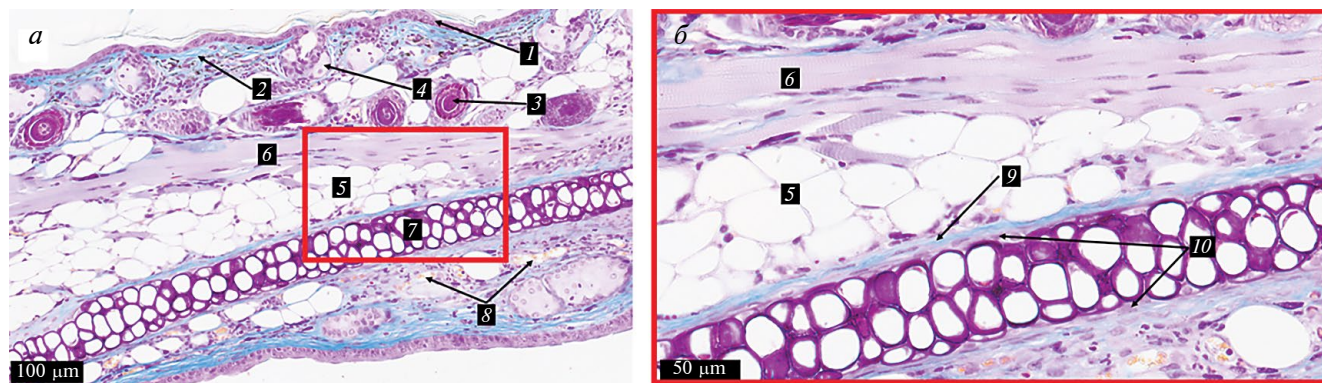
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Гистологический анализ

Снаружи ушная раковина покрыта эпидермисом — многослойным плоским ороговевающим эпителием. Под эпителием ушной раковины располагается дерма — плотная соединительная ткань, в которой обнаруживаются волосные фолликулы и сальные железы (рис. 1).

Слой, располагающийся под дермой, является гиподермой, представленной белыми адипоцитами и рыхлой соединительной тканью. Также в составе ткани ушной раковины присутствуют поперечно-полосатые скелетные миоциты, отвечающие за произвольные движения ушами (рис. 1).

В состав ушной раковины также входит пластинка эластического хряща, покрытого надхрящницей. Надхрящница имеет два слоя — внутренний, или хондрогенный, состоящий из хондробластов,



**Рис. 1.** Ушная раковина *Acomys*. 1 — эпидермис, 2 — дерма, 3 — волосной фолликул, 4 — сальные железы, 5 — белые адипоциты, 6 — поперечно-полосатые скелетные миоциты, 7 — эластический хрящ, 8 — кровеносный сосуд, 9 — фиброзный слой надхрящницы, 10 — хондрогенный слой надхрящницы. Окраска по Маллори. Ув. x200 (а), x500 (б).

и наружный — фиброзный слой, представляющий собой волокна коллагена I типа (рис. 1) [8, 9].

Таким образом, ушная раковина является сложной гетерогенной структурой, состоящей из клеток разного происхождения (эктодерма, мезодерма и энтодерма).

Эти базовые наблюдения, полученные по результатам гистологического анализа, будут учтены при определении клеточных популяций на основе профилей экспрессии РНК единичных клеток.

### Кластеризация и аннотация клеточных типов

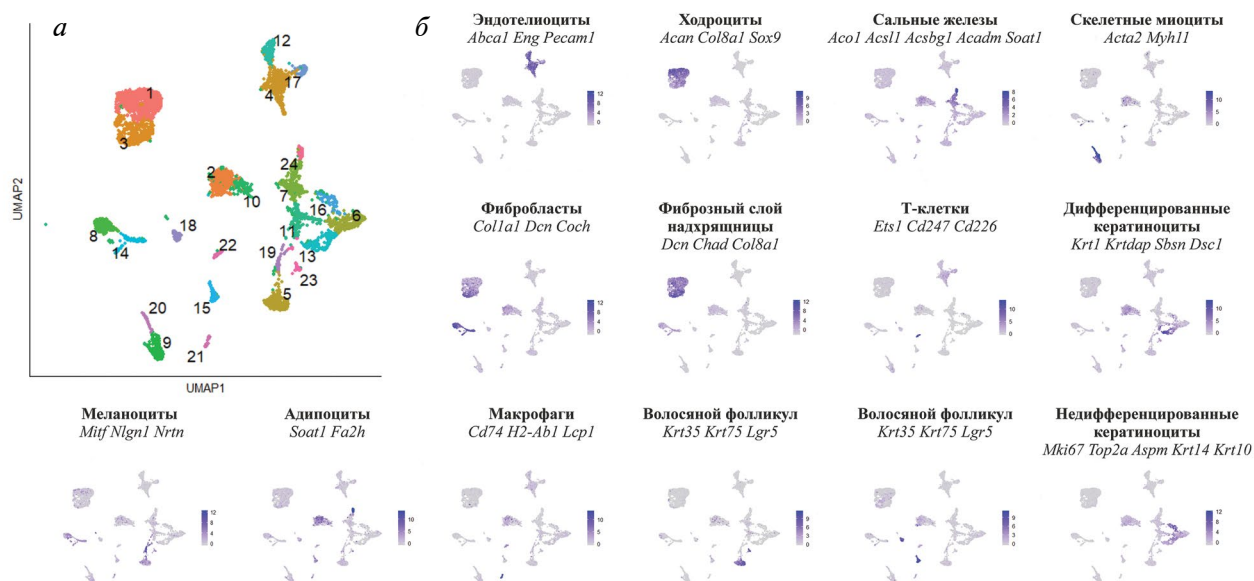
В результате анализа данных scRNA-Seq было идентифицировано 24 клеточных кластера, которые в дальнейшем были проаннотированы при помощи известных из литературы маркерных генов (рис. 2). Более конкретно, оценивалась относительная выраженность экспрессии набора генов, характерных для того или иного клеточного типа, по сравнению с клетками, не входящими в рассматриваемый кластер.

Таким образом, были определены следующие типы клеток ушной раковины: клетки хрящевой ткани, эпидермис и его производные, эндотелий, фибробласты, клетки иммунной системы, нейроглия, скелетные миоциты и адипоциты. Кластеры 2 и 10 остались неаннотированными ввиду слабого пересечения списка генов-«маркеров» с литературными данными (рис. 2).

Клетки хрящевой ткани были определены по специфичной экспрессии следующих генов: гена *Sox9* (SRY-Box Transcription Factor 9), белок которого является ключевым фактором транскрипции в развивающемся и взрослом хряще [10], гена *Acan* (Agrecan), кодирующего хрящевой специфичный протеогликановый ядерный белок [11], гена *Chad* (Chondroadherin), который кодирует белок матрикса хряща, опосредующий адгезию изолированных хондроцитов [12], гена *Mfap4* (Microfibril associated protein 4), который кодирует матричный белок, способствующий развитию и стабильности эластичных волокон [13].

Фибробласты были определены по экспрессии генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса, — *Colla1* (Collagen, type I, alpha 1) и *Dcn* (Decorin) [14, 15]. Экспрессия этих же генов обнаруживается в кластере № 3, который объединен с кластером № 1 — хрящевой тканью. Таким образом, можно сделать вывод о том, что объединенные кластеры № 1 и № 3 содержат в себе клетки хрящевой ткани — хондробласты — и клетки фиброзного слоя надхрящницы — фибробласты, что непосредственно подтверждается морфологическим анализом при визуальном наблюдении с использованием световой микроскопии (рис. 1).

Кератиноциты и производные кожи были разделены на кластеры недифференцированных кератиноцитов, или базальных кератиноцитов, дифференцированных кератиноцитов (шиповатый и гранулярный слой), сальных желез, волосяных фолликулов.



**Рис. 2.** Кластеризация и аннотация клеточных типов по данным scRNA-Seq. *a* — кластерограмма (кластеры 1–24) клеток ушной раковины *Acomys cahirinus*, построенная методом UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection); *b* — визуализация усредненной экспрессии ряда маркерных генов, характерных для различных клеточных типов.

Базальные кератиноциты были идентифицированы по экспрессии генов *Aspm* (Assembly factor for spindle microtubules) и *Mki67* (Marker of proliferation Ki-67), белки которых участвуют в митотическом делении, гена *Top2a* (DNA topoisomerase II alpha), кодирующего ДНК-топоизомеразу – фермент, который контролирует и изменяет топологические состояния ДНК во время транскрипции, а также гена *Krt14* (Keratin 14) [16].

Для кластера, представляющего дифференцированные кератиноциты, характерна экспрессия таких генов как *Krt1* (Keratin 1), *Krt1dap* (Keratinocyte differentiation associated protein), кодирующего белок, участвующий в регуляции дифференцировки кератиноцитов, *Sbsn* (Suprabasin), молекулярная функция которого на данный момент до конца неизвестна, но по литературным данным представленный ген является маркером дифференцированных кератиноцитов, а также гена *Dsc1* (Desmocollin 1), кодирующего белок, который является компонентом межклеточных десмосомных соединений [17].

Адиipoциты отличались специфической экспрессией гена *Fa2h* (Fatty acid 2-hydroxylase), продукт которого участвует в биосинтезе жирных кислот [18], а также гена *Soat1* (Sterol O-acyltransferase 1), кодирующего ключевой фермент биосинтеза холестерина [19]. Данный кластер клеток располагается в непосредственной близости с кластером сальных желез, идентифицированных по экспрессии генов *Acsf1* (Acyl-CoA synthetase long chain family member 1), *Acsbg1* (Acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1), *Acadm* (Acyl-CoA dehydrogenase medium chain), *Aco1* (Aconitase 1). Белки, кодируемые генами *Acsf1* и *Acsbg1*, катализируют превращение жирных кислот в Ацил-КоА; *Acadm* кодирует ацил-КоА-дегидрогеназу – оксиредуктазу, катализирующую первую стадию β-окисления [20]. Заметим, что адиipoциты также экспрессируют гены *Aco1*, *Acadm* и *Acsbg1*, так как вместе с клетками сальных желез участвуют в метаболизме жирных кислот, поэтому знание морфологической структуры исследуемой ткани является ценным подспорьем в процессе обработки транскриптомных данных, позволяя подтвердить наличие двух разных кластеров клеток, пусть даже экспрессирующих схожие наборы генов.

Клеточный кластер, клетки которого относятся к волосаному фолликулу, был идентифицирован по специфичной экспрессии гена *Lgr5* (Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5), кодирующего R-спондиновый рецептор, потенцирующий канонический сигнальный путь Wnt и являющийся маркером стволовых клеток всех областей волосаного фолликула [21].

Специфичными по уровню экспрессии генами для эндотелиальных клеток были *Pecam* (Platelet/

endothelial cell adhesion molecule 1), который кодирует один из основных белков межклеточных контактов эндотелиальных клеток [22], *Eng* (Endoglin), белок которого является основным гликопротеином клеточной мембраны эндотелия сосудов [23], *Esam* (Endothelial cell adhesion molecule), кодирующий молекулу адгезии к эндотелиальным клеткам [24], а также *Cldn5* (Claudin 5), основной белок которого обеспечивает адгезию эндотелиальных клеток и формирование плотных контактов [25]. При этом мы обнаружили три клеточных кластера, экспрессирующих эти гены, – это кластеры 4, 12, 17. Опираясь на знания классической гистологии, мы предполагаем, что это обусловлено наличием эндотелиоцитов в трех разных типах сосудов – венах, артериях и лимфатических сосудах [26].

Клетки иммунной системы, такие как макрофаги, отличались специфичной экспрессией генов гистосовместимости – *Cd74* (HLA class II histocompatibility antigen gamma chain) и *H2-Ab1* (Histocompatibility 2, class II antigen A), а также маркера активации иммунных клеток – гена *Cd44* [27–29]. Т-лимфоциты были идентифицированы по экспрессии генов поверхностных кластеров дифференциации *Cd247*, *Cd226* и гену *Ets1* (ETS proto-oncogene 1, transcription factor), белок которого является транскрипционным фактором, непосредственно контролирующим экспрессию генов цитокинов и хемокинов и может контролировать дифференцировку, выживание и пролиферацию лимфоидных клеток [30, 31].

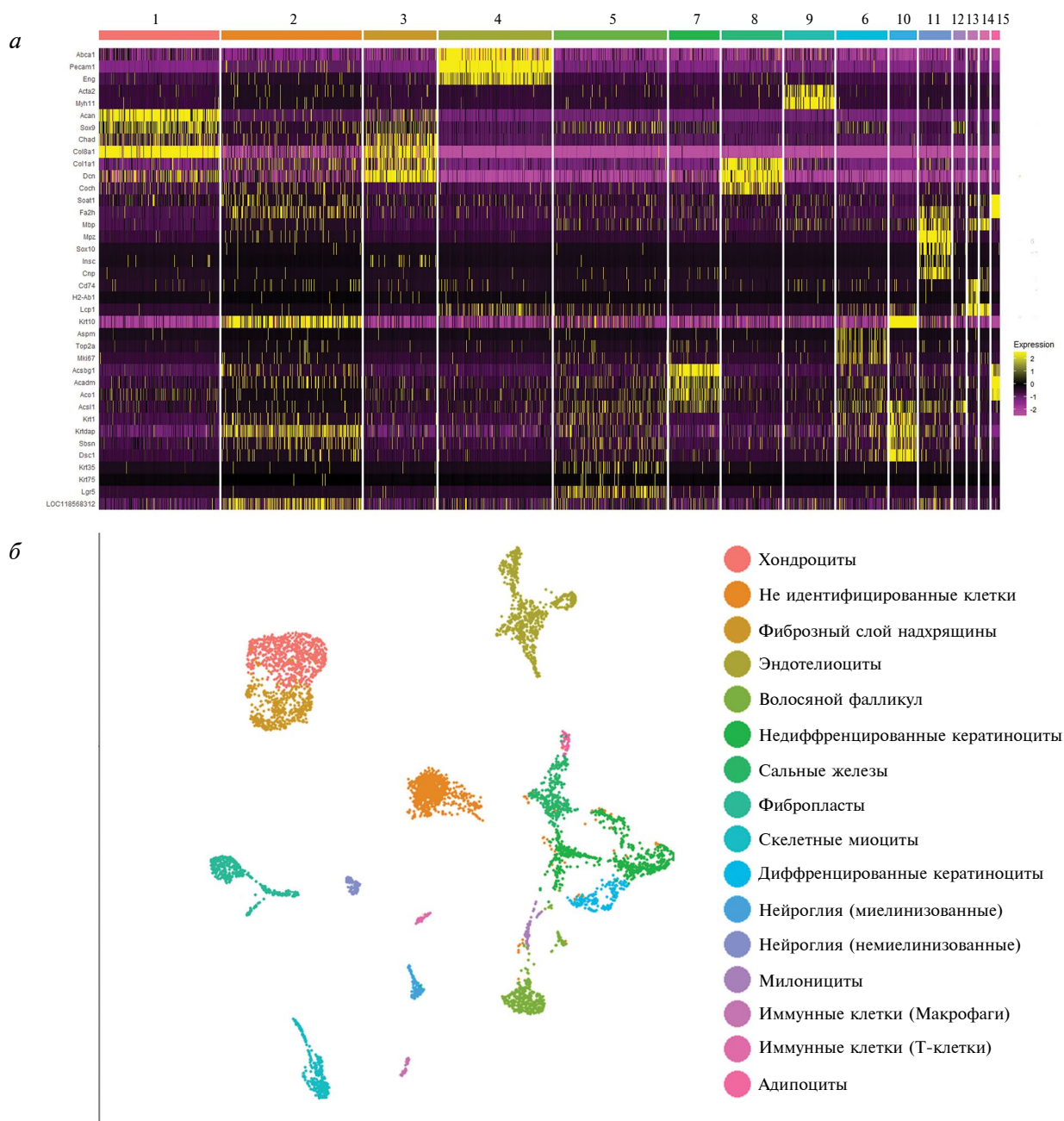
Гены, кодирующие различные подтипы белка миелина (Myelin protein zero, Myelin basic protein, Myelin proteolipid protein), были специфичны по своей экспрессии для клеток нейроглии [32–34].

Клетки, которые были определены как скелетные миоциты, экспрессировали ген *Myh11* (Myosin-11), белок которого участвует в сокращении мышечной ткани, преобразуя химическую энергию в механическую посредством гидролиза АТФ [35]. Как уже было описано выше, ушная раковина мышей имеет в своем составе поперечно-полосатую мускулатуру, которая визуализируется при морфологическом анализе (рис. 1).

Идентификация клеточного кластера № 19 была затруднена в связи с отсутствием четкой связи литературных данных с экспрессируемыми в этом кластере генами. Но на основании близкого взаиморасположения к кластерам кератиноцитов и экспрессии такого гена как *Mitf* (Melanocyte inducing transcription factor) мы предположительно идентифицировали данный кластер клеток как меланоциты. Белок, кодируемый данным геном, регулирует развитие меланоцитов и отвечает за специфичную для пигментных клеток транскрипцию ферментов меланогенеза [36]. Косвенно наше предположение может подтверждаться экспрессией генов,

характерных для нервной ткани, так как меланоциты являются производными нервного гребня [37]. Подобными генами являются *Nlgn1* (Neurologin 1), продукт которого является членом семейства белков поверхности нейрональных клеток и может участвовать в формировании и remodelировании синапсов, а также *Nrtin* (Neurturin), функция белка которого заключается в поддержании выживания симпатических нейронов [38, 39].

Неидентифицированные клетки были охарактеризованы экспрессией различных генов, кодирующих белки рибосомы (*Rpl41*, *Rps19*, *Rpl32*). Появление этого кластера клеток, вероятнее всего, является техническим артефактом, что подтверждается довольно заметными уровнями экспрессии в нем и других генов (рис. 3, кластер 2). Таким образом, образование данного кластера было обусловлено повышенным (относительно других клеток)



**Рис. 3.** Экспрессия маркерных генов и финальная аннотация клеточных типов. *а* — тепловая карта, демонстрирующая наиболее специфично экспрессируемые гены в каждом кластере клеток (1–15); *б* — кластерограмма клеток ушной раковины *Acomys cahirinus* с аннотацией клеточных типов, построенная методом UMAP.

уровнем экспрессии генов белков рибосомы, которые сами по себе ничего не говорят о биологической природе клеток, но, давая сильный сигнал, мешают корректной оценке общего профиля экспрессии генов и влекут мнимое выделение клеток в отдельный кластер из более крупного.

Итак, в результате аннотации выявленные алгоритмически кластеры №№ 1 и 3; 8 и 14; 5 и 23; 9 и 20; 4, 12 и 17; 6, 11 и 16; 2 и 10 были объединены в кластеры более высокого порядка, поскольку обладают сходным профилем экспрессии маркерных генов.

Присвоение выявленным программным образом кластерам клеток конкретных клеточных типов дает хорошие перспективы для последующего детального анализа полученных данных (рис. 3). Большинство аннотированных клеточных кластеров сходится с гистологической картиной ушной раковины *Acomys cahirinus*.

Таким образом, аннотация клеточных кластеров с помощью оценки уровней экспрессии известных маркерных генов может быть дополнена методами классического морфологического анализа с использованием световой микроскопии. Благодаря такой интеграции мы получаем всестороннее и многомерное представление об архитектуре тканей, позволяющее точно идентифицировать и охарактеризовать различные клеточные популяции в их пространственном расположении, как в статичном состоянии, так и в динамике в эксперименте. Гистологическая оценка способна расширить представление о клеточных популяциях, сгруппированных на основании интенсивности экспрессии генов, и разделить такие кластеры на отдельные морфологические единицы.

Развитие технологий секвенирования РНК единичных клеток в будущем, очевидно, приведет к еще более полной интеграции наблюдений, полученных при анализе профилей экспрессии генов и морфологическом исследовании тканей, ведь информация о взаимном расположении клеток относительно друг друга фиксируется уже в рамках пробоподготовки образца для секвенирования.

Однако метод пространственной транскриптомики единичных клеток на сегодняшний день не обладает достаточной разрешающей способностью в контексте поиска отдельных уникальных клеточных типов в большом массиве тканевых элементов. В связи с этим комбинация картины классической гистологии и профиля экспрессии РНК единичных клеток является оптимальным методом в решении биомедицинских задач.

Дальнейшие исследования с использованием результатов аннотации клеточных типов помогут открыть молекулярно-клеточные механизмы качественной регенерации тканей иглистых мышей.

Проект поддержан грантом 075-15-2021-1344 Министерства науки и высшего образования РФ.

Исследование одобрено Этическим комитетом Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета от 9 марта 2023 г., протокол № 40.

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. Maden M., Varholick J.A. Model systems for regeneration: The spiny mouse, *Acomys cahirinus* // Development. 2020. V. 147. № 4. <https://doi.org/10.1242/dev.167718>
2. Билялов А.И., Филимошина Д.Д., Филатов Н.С. и др. У мышей рода *Acomys* после травмы восстанавливается эластический хрящ ушной раковины // Гены и клетки. 2022. Т. 17. № 1. С. 42–47. (Bilyalov A.I., Filimoshina D.D., Filatov N.S. et al. In mice of the genus *Acomys*, the elastic cartilage of the auricle is restored after injury // Genes and cells. 2022. V. 17. № 1. P. 42–47.) <https://doi.org/10.23868/202205003>
3. Kuksin M., Morel D., Aglave M. et al. Applications of single-cell and bulk RNA sequencing in onco-immunology // Eur. J. Cancer. 2021. V. 149. P. 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.03.005>
4. Nguyen E.D., Fard V.N., Kim B.Y. et al. Genome report: Chromosome-scale genome assembly of the African spiny mouse (*Acomys cahirinus*) // bioRxiv 2023.04.03.535372. <https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535372>
5. Lun A.T.L., Riesenfeld S., Andrews T. et al. EmptyDrops: Distinguishing cells from empty droplets in droplet-based single-cell RNA sequencing data // Genome Biol. 2019. V. 20. № 1. P. 63. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1662-y>
6. Wolock S.L., Lopez R., Klein A.M. Scrublet: Computational identification of cell doublets in single-cell transcriptomic data // Cell Syst. 2019. V. 8. № 4. P. 281–291.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.11.005>
7. Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data // Cell. 2021. V. 184. № 13. P. 3573–3587. e29. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2021.04.048>
8. Bairati A., Comazzi M., Gioria M. A comparative study of perichondrial tissue in mammalian cartilages // Tissue Cell. 1996. V. 28. № 4. P. 455–468. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(96\)80031-0](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(96)80031-0)
9. Treuting P.M., Dintzis S.M. 22 — Special senses: Ear // Comparative Anatomy and

- Histology, Acad. Press, 2012. P. 419–432.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00022-6>
10. Lefebvre V., Angelozzi M., Haseeb A. SOX9 in cartilage development and disease // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2019. V. 61. P. 39–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.008>
  11. Dateki S. ACAN mutations as a cause of familial short stature // *Clin. Pediatr. Endocrinol.* 2017. V. 26. № 3. P. 119–125.  
<https://doi.org/10.1297/cpe.26.119>
  12. Batista M.A., Nia H.T., Önnarfjörð P. et al. Nanomechanical phenotype of chondroadherin-null murine articular cartilage // *Matrix Biol.* 2014. V. 38. P. 84–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.05.008>
  13. Taylor S.E., Lee J., Smeriglio P. et al. Identification of human juvenile chondrocyte-specific factors that stimulate stem cell growth // *Tissue Eng. Part A.* 2016. V. 22. № 7–8. P. 645–653.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0366>
  14. Boot-Handford R.P., Tuckwell D.S. Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest // *Bioessays.* 2003. V. 25. № 2. P. 142–151.  
<https://doi.org/10.1002/bies.10230>
  15. Reed C.C., Iozzo R.V. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis // *Glycoconj. J.* 2002. V. 19. № 4–5. P. 249–255.  
<https://doi.org/10.1023/A:1025383913444>
  16. Billi A.C., Ma F., Plazyo O. et al. Nonlesional lupus skin contributes to inflammatory education of myeloid cells and primes for cutaneous inflammation // *Sci. Transl. Med.* 2022. V. 27. № 14. P. 642.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn2263>
  17. Wang S., Drummond M.L., Guerrero-Juarez C.F. et al. Single cell transcriptomics of human epidermis identifies basal stem cell transition states // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 4239.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18075-7>
  18. Alderson N.L., Maldonado E.N., Kern M.J. et al. FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain // *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. № 12. P. 2772–2780.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.M600362-JLR200>
  19. Xu Y., Du X., Turner N. et al. Enhanced acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase activity increases cholesterol levels on the lipid droplet surface and impairs adipocyte function // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 50. P. 19306–19321.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011160>
  20. Shih B.B., Nirmal A.J., Headon D.J. et al. Derivation of marker gene signatures from human skin and their use in the interpretation of the transcriptional changes associated with dermatological disorders // *J. Pathol.* 2017. V. 241. № 5. P. 600–613.  
<https://doi.org/10.1002/path.4864>
  21. Polkoff K.M., Gupta N.K., Green A.J. et al. LGR5 is a conserved marker of hair follicle stem cells in multiple species and is present early and throughout follicle morphogenesis // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 9104.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-13056-w>
  22. Park S., DiMaio T.A., Scheef E.A. et al. PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010. V. 299. № 6. P. 1468–1484.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00246.2010>
  23. Rossi E., Bernabeu C., Smadja D.M. Endoglin as an adhesion molecule in mature and progenitor endothelial cells: A function beyond TGF- $\beta$  // *Front. Med.* 2019. V. 6.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00010>
  24. Inoue M., Ishida T., Yasuda T. et al. Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction // *Microvasc. Res.* 2010. V. 80. № 2. P. 179–187.  
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.04.005>
  25. Ma S.C., Li Q., Peng J.Y. et al. Claudin-5 regulates blood-brain barrier permeability by modifying brain microvascular endothelial cell proliferation, migration, and adhesion to prevent lung cancer metastasis // *CNS Neurosci. Theor.* 2017. V. 23. № 12. P. 947–960.  
<https://doi.org/10.1111/cns.12764>
  26. Fajardo L.F. The complexity of endothelial cells. A review // *Am. J. Clin. Pathol.* 1989. V. 92. № 2. P. 241–250.  
<https://doi.org/10.1093/ajcp/92.2.241>
  27. Su H., Na N., Zhang X., Zhao Y. The biological function and significance of CD74 in immune diseases // *Inflamm. Res.* 2017. V. 66. № 3. P. 209–216.  
<https://doi.org/10.1007/s00011-016-0995-1>
  28. Stephens W.Z., Kubinak J.L., Ghazaryan A. et al. Epithelial-myeloid exchange of MHC class II constrains immunity and microbiota composition // *Cell Rep.* 2021. V. 37. № 5.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109916>
  29. Hou W., Kong L., Hou Z., Ji H. CD44 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer // *BMC Med. Genomics.* 2022. V. 15. № 1. P. 225.  
<https://doi.org/10.1186/s12920-022-01383-w>
  30. Muruganandam M., Ariza-Hutchinson A., Patel R.A., Sibbitt W.L. Jr. Biomarkers in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of systemic sclerosis // *J. Inflamm. Res.* 2023. V. 16. P. 4633–4660.  
<https://doi.org/10.2147/JIR.S379815>
  31. Kendirli A., de la Rosa C., Lämmle K.F. et al. A genome-wide in vivo CRISPR screen identifies essential regulators of T cell migration to the CNS in a multiple sclerosis model // *Nat. Neurosci.* 2023. V. 26. № 10. P. 1713–1725.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-023-01432-2>

32. Kozina A.A., Baryshnikova N.V., Ilinskaya A.Y. et al. Novel mutation in the MPZ gene causes early-onset but slow-progressive Charcot-Marie-Tooth disease in a Russian family: A case report // J. Int. Med. Res. 2022. V. 50. № 12.  
<https://doi.org/doi: 10.1177/03000605221139718>
33. Smirnova E.V., Rakitina T.V., Ziganshin R.H. et al. Comprehensive atlas of the myelin basic protein interaction landscape // Biomolecules. 2021. V. 11. № 11.  
<https://doi.org/10.3390/biom11111628>
34. Kim D., An H., Fan C., Park Y. Identifying oligodendrocyte enhancers governing Plp1 expression // Hum. Mol. Genet. 2021. V. 30. № 23. P. 2225–2239.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddab184>
35. Ruan J., Zhang L., Hu D. et al. Novel Myh11 dual reporter mouse model provides definitive labeling and identification of smooth muscle cells-brief report // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2021. V. 41. № 2. P. 815–821.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315107>
36. Goding C.R., Arnheiter H. MITF-the first 25 years // Genes Dev. 2019. V. 33. № 15–16. P. 983–1007.  
<https://doi.org/10.1101/gad.324657.119>
37. Кичигина Т.Н., Грушин В.Н., Беликова И.С., Мядель О.Д. Меланоциты: строение, функции, методы выявления, роль в кожной патологии // Вестн. Ви-тебского гос. мед. ун-та. 2007. Т. 6. № 4. С. 5–16.  
<https://eliv.vsmu.by/handle/123/8528>
38. Jeong J., Han W., Hong E. et al. Regulation of NLGN3 and the synaptic Rho-GEF signaling pathway by CDK5 // J. Neurosci. 2023. V. 43. № 44. P. 7264–7275.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2309-22.2023>
39. Sato S., Suzuki Y., Kikuchi M. et al. Sputum neur-turin levels in adult asthmatic subjects // J. Asthma Allergy. 2023. V. 16. P. 889–901.  
<https://doi.org/10.2147/JAA.S421742>

## Combination of Histological and Transcriptomic Approaches for Cell Types Annotation in Non-Model Organisms by Example of Spiny Mice *Acomys cahirinus*

N. S. Filatov<sup>1</sup>, A. I. Bilyalov<sup>1, 2</sup>, G. R. Gazizova<sup>1</sup>, A. A. Bilyalova<sup>1</sup>, E. I. Shagimardanova<sup>1, 2</sup>,  
M. V. Vorontsova<sup>3</sup>, A. P. Kiyasov<sup>1</sup>, O. A. Gusev<sup>1, 4, 5</sup>, O. S. Kozlova<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volgaregion) Federal University, Kazan, 420008 Russia

<sup>2</sup>Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, 111123 Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>4</sup>Juntendo University School of Medicine, Tokyo, 113-8421 Japan

<sup>5</sup>LIFT Center LLC, Moscow, Skolkovo, 121205 Russia

\*e-mail: olga-sphinx@yandex.ru

In mammals, cartilage tissue has a low potential for regeneration. Typically, the defect site is replaced by connective tissue. The *Acomys cahirinus* mouse is a relatively new model for studying tissue regeneration processes, specifically the elastic cartilage of the auricle. To investigate the molecular genetic mechanisms responsible for these processes and gain insight into the cellular and tissue composition of the intact auricle, we utilized the method of single-cell RNA sequencing (scRNA-seq). This method enables quantification of gene expression in the sample and modeling of cell clustering based on expression profiles. This allows for assessment of sample heterogeneity in terms of specific cell populations. Annotation of cell types, particularly in non-model organisms, should be supported by classical morphological studies to allow for more detailed identification of cell populations. This is necessary to separate clusters of cells that are grouped statistically based on similar expression profiles of a group of genes into smaller subpopulations. The objective of this study was to annotate all cell types present in the intact *Acomys cahirinus* auricle using a combination of transcriptomic approaches and classical histology methods. The study resulted in the annotation of 24 cell clusters based on known marker genes and by comparing genetic and morphological data.

**Keywords:** single cell sequencing, *Acomys cahirinus*, cell types annotation, regeneration.

## НОВЫЙ ИНСЕРЦИОННЫЙ ЭЛЕМЕНТ В ГЕНЕ *ToxA* ГРИБА *Pyrenophora tritici-repentis*

© 2024 г. Н. В. Мироненко<sup>1</sup> \*, А. С. Орина<sup>1</sup>, Н. М. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия  
\*e-mail: nina2601mir@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 08.04.2024 г.

Аскомицетный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* является возбудителем желтой пятнистости листьев пшеницы. Среди некротрофных эффекторов, которые продуцирует гриб, наиболее изучен некрот-индуцирующий белковый токсин Ptr ToxA, кодируемый геном *ToxA*. Ранее нами были выявлены десять штаммов *P. tritici-repentis* из Казахстана и России с геном *ToxA*, амплифицированный фрагмент которого со специфичными для *ToxA* праймерами оказался большего размера, чем ожидалось. Секвенирование последовательности этого фрагмента у трех штаммов гриба выявило присутствие инсерционного элемента PtrHr2 размером 170 пн, локализованного в экзоне 2 гена *ToxA*. Последовательность PtrHr2 включает три пары взаимно комплементарных участков длиной 16, 8 и 6 пн, формирующих вторичную структуру типа «шпильки». Установлена неспособность штаммов *P. tritici-repentis*, обладающих инсерцией в гене *ToxA*, вызывать некроз на листьях сорта Glenlea, дифференцирующего наличие Ptr ToxA в штаммах патогена, что свидетельствует о нарушении экспрессии мутантного гена *ToxA*. Тем не менее мутантный ген *ToxA*, содержащий PtrHr2, сохраняется в 45% конидиального потомства гриба. Гомологичные инсерционному элементу PtrHr2 последовательности встречаются в некодирующих частях гена *ToxB* и его гомологов у штаммов *P. tritici-repentis*, а также в геномах грибов других видов, что свидетельствует о его транспозонной природе.

**Ключевые слова:** желтая пятнистость, фитотоксин, некротрофный эффектор, инсерционный элемент PtrHr2, ген *ToxA*.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090043 **EDN:** AEQRLC

*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler — аскомицетный гемибиотрофный фитопатогенный гриб, является возбудителем желтой пятнистости листьев пшеницы. Болезнь вызывает существенные потери урожая пшеницы во всем мире, которые при благоприятных для патогена условиях могут составлять 18–49 % [1, 2].

Гриб *P. tritici-repentis* продуцирует три известных хозяин-специфичных некротрофных эффектора: Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC, которые кодируются генами *ToxA*, *ToxB* и *ToxC* соответственно и индуцируют симптомы некроза или хлороза на сортах пшеницы с соответствующими генами восприимчивости *Tsn1*, *Tsc2* и *Tsc1* [3, 4].

Известно, что ген *ToxA* попал в геном гриба *P. tritici-repentis* путем горизонтального переноса от другого патогена, обитающего на листьях пшеницы, — *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous [5]. Появление *ToxA* в геноме *P. tritici-repentis* считается одной из основных причин

увеличения экономической значимости желтой пятнистости листьев пшеницы [6].

В штаммах *Parastagonospora nodorum* описано 15 гаплотипов (H1 — H15) гена *ToxA*, отличающихся одиночными заменами в 25 нуклеотидных сайтах [7]. Эти гаплотипы кодируют различные изоформы белка, которые различаются по активности в отношении растения, а также влияют на интенсивность спороношения гриба [4]. В то же время в штаммах *Pyrenophora tritici-repentis* ген *ToxA* отличается консервативностью [5, 8], обнаружены только три его гаплотипа (H14 — H16), которые в результате более тщательного анализа были отнесены к одному гаплотипу *ToxA1*, согласно последней предложенной номенклатуре гаплотипов гена *ToxA* [9]. Второй гаплотип гена *ToxA* обнаружен в японских изолятах *P. tritici-repentis* [10] и обозначен *ToxA24* [9].

Гаплотипы *ToxA* различаются наличием мутаций типа SNP, которые могут влиять на структуру транслируемого белка. Другим механизмом изменчивости гена можно считать структурные

изменения в гене, обусловленные появлением инсерций или делеций. Поскольку ген *ToxA* кодирует один из основных известных факторов патогенности *P. tritici-repentis*, необходимо постоянное наблюдение за его изменениями, которые могут влиять на вирулентность гриба. Ранее нами были обнаружены отдельные штаммы *P. tritici-repentis*, у которых увеличен размер амплифицированного фрагмента со специфичными для последовательности *ToxA* праймерами за счет предполагаемой инсерции [11].

Цель исследования — провести анализ структуры мутантных генов *ToxA* у штаммов *P. tritici-repentis* и оценить влияние предполагаемого инсерционного элемента на патогенные свойства гриба.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Коллекция штаммов

В качестве объектов исследования были выбраны десять моноконидиальных штаммов *P. tritici-repentis*, выделенных из листьев пшеницы с симптомами желтой пятнистости и имеющих ген *ToxA* с предполагаемой инсерцией. Среди них пять штаммов были из северо-казахстанской популяции 2022 г. (Каз22-С), один — из северо-казахстанской популяции 2020 года (Каз20-С) и четыре — из татарстанской популяции 2022 года (Тат22) [12].

### Экстракция ДНК, ПЦР и электрофорез

Культуры гриба выращивали на среде V4, разработанной на основе смеси соков четырех овощей, при 22 °С в течение 7–10 сут [13]. Выделение геномной ДНК из мицелия грибов проводили СТАВ-методом [14].

Для детекции гена *ToxA* амплифицировали ДНК каждого штамма с праймерами TA51F/TA52R (TA51F 5'-GCGTTCTATCCTCGTACTTC-3'; TA52R 5'-GCATTCTCCAATTTTCACG-3') [15] с ожидаемым размером продукта 573 пн. Наличие специфического фрагмента и его размер определяли путем электрофореза продуктов амплификации в 1.7%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Продукты амплификации гена *ToxA* (около 800 пн), превышающие ожидаемый размер, элюировали из геля и очищали с помощью метода, основанного на сорбции ДНК на тонкодисперсной двуокиси кремния [16].

### Определение и анализ нуклеотидной последовательности *ToxA*

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ToxA* трех штаммов *P. tritici-repentis* Каз20-С-12, Каз22-С-А-53 и Каз22-С-А-64

проводили методом Сэнгера в фирме Beagle (Санкт-Петербург, Россия). Процедуры выравнивания и ручного редактирования нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Thermo Fisher Scientific). Полученные нуклеотидные последовательности были размещены в базе данных GenBank NCBI (OR072645–OR072647) и проверены на сходство с ранее депонированными с помощью инструмента BLAST. Визуализацию выравнивания полученных и референсных последовательностей проводили в программе Jalview 2.11.3.0 [17].

Вторичная структура инсерционного элемента гена *ToxA* была рассчитана с использованием программы RNAstructure 6.0 [18], предсказывающей структуру с максимальной свободной энергией, и визуализирована с помощью программы StructureEditor 6.0.

### Анализ патогенности анализируемых штаммов

Расовую принадлежность десяти штаммов *P. tritici-repentis*, несущих ген *ToxA* с инсерционным элементом, определяли путем инокуляции пшеницы сорта Glenlea, линий 6B365 и 6B662, дифференцирующих образование некротрофных эффекторов Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC соответственно [19, 20]. Отрезки листьев от 5–10 растений каждого дифференциатора в возрасте семи дней помещали в кювету на поверхность фильтровальной бумаги, увлажненной 0.004%-ным раствором бензимидазола, и опрыскивали суспензией конидий каждого штамма *P. tritici-repentis* с концентрацией 3000–5000 конидий/мл по 200–300 мкл суспензии на каждый образец. Кюветы инкубировали при температуре 22 °С и освещенности 1500 Лм, фотопериод составлял 12 ч. Оценку вирулентности проводили на 5–6-е сут по наличию или отсутствию некрозов и хлорозов на инокулированных листьях [13, 21].

### Анализ митотической стабильности гена *ToxA*

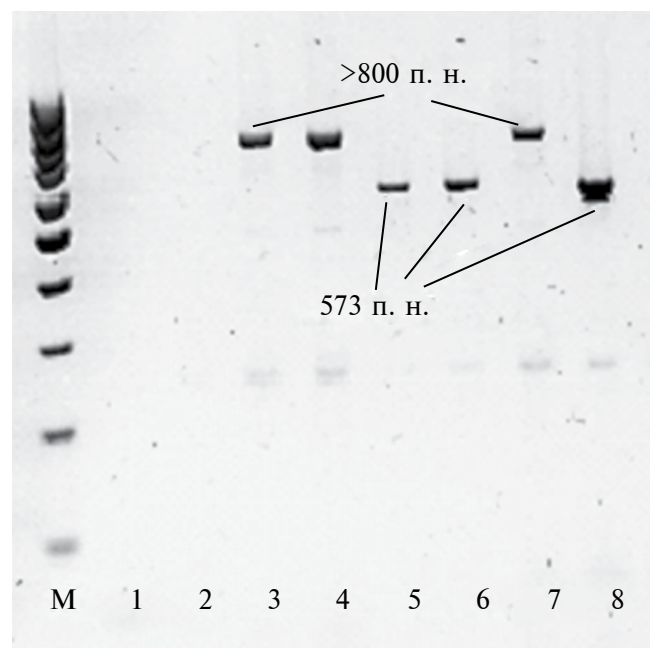
Для штамма *P. tritici-repentis* Каз20-С-12, несущего *ToxA*, при пересеве отдельных конидий с помощью стерильной иглы были получены 22 моноконидиальных субклона. Выделение геномной ДНК из мицелия и детекцию гена *ToxA* в геноме субклонов проводили как описано выше. В качестве параллельного контроля проводили амплификацию гена *CHS1*, присутствующего во всех штаммах *P. tritici-repentis*, с помощью праймеров CHS-79F и CHS-354R (CHS-79F 5'-TGCGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG-3' и CHS-354R 5'-TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG-3') по протоколам авторов [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ToxA*

Продукты амплификации гена *ToxA* с размером более 800 пн у трех штаммов *P. tritici-repentis* (Каз20-С-12, Каз22-С-А-53 и Каз22-С-А-64) (рис. 1) были вырезаны из агарозного геля, очищены и секвенированы. Полученные нуклеотидные последовательности оказались идентичны. Их сравнение с референсными последовательностями гена *ToxA* штаммов *P. tritici-repentis* AB42 (MN062700), EW13061-2-1 (MH017415), EW4-4 (MH017417), NZ1 (MH017419) и SN001C (MH017418) выявило области 100%-ного сходства на участках 741–803 и 974–1468 пн. Между сходными участками гена анализируемых штаммов находится инсерционный элемент размером 170 пн (рис. 2). Также обнаружен мотив из восьми нуклеотидов CCGGTTAC, который расположен перед инсерцией и идентичен последовательностям анализируемых и референсных штаммов *P. tritici-repentis*, однако он также присутствует в конце инсерционного элемента PtrHr2.

Внутри инсерционного элемента выявлены три пары взаимно комплементарных участков длиной 16, 8 и 6 пн, которые формируют вторичную



**Рис. 1.** Электрофорез продуктов амплификации фрагмента гена *ToxA* штаммов *P. tritici-repentis* со специфичными праймерами. М – маркер длин фрагментов GeneRuler 100 bp; 1, 2 – негативный контроль; 3 – штамм Каз20-С-12; 4 – Каз22-С-А-53, 7 – Каз22-С-А-64, 5, 6 и 8 – штаммы *P. tritici-repentis* из популяции Каз22-С.

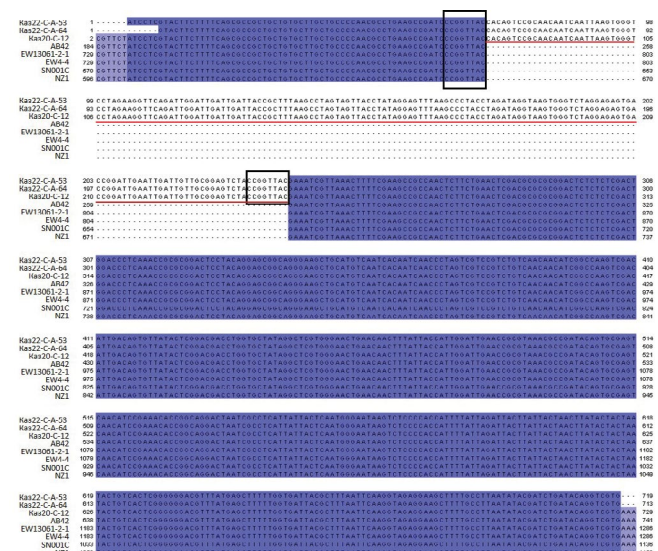
структуру инсерционного элемента в виде «шпильки» (рис. 3).

### Вирулентность штаммов *P. tritici-repentis*, несущих ген *ToxA* с инсерционным элементом

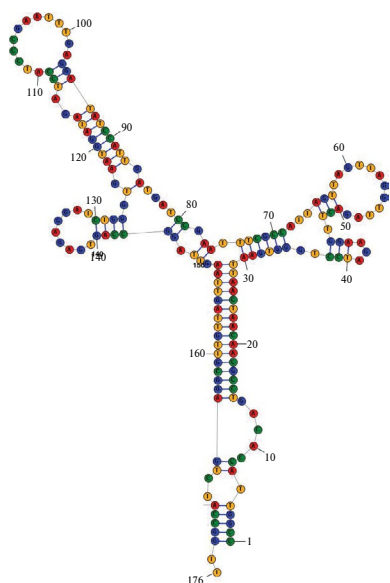
Анализ расовой принадлежности штаммов *P. tritici-repentis* с помощью инокуляции отрезков листьев пшеницы сортов-дифференциаторов выявил среди анализируемых десяти штаммов гриба представителей двух рас, не образующих эффектор Ptr ToxA. Четыре штамма из Татарстана, а также Каз20-12 и Каз22-С-А-64 были отнесены к авирулентной расе 4, еще четыре штамма из Казахстана, включая Каз22-С-А-53, – к расе 5, поражающей линию, дифференцирующую штаммы гриба с геном *ToxB*.

### Митотическая стабильность гена *ToxA* с инсерционным элементом

Среди 22 моноконидиальных субклонов штамма *P. tritici-repentis* Каз20-С-12, несущего ген *ToxA* с инсерционным элементом PtrHr2, у десяти субклонов (45%) в результате ПЦР амплифицировался продукт ~800 пн, подтверждающий присутствие гена. У остальных субклонов продукт амплификации отсутствовал при наличии положительной реакции ПЦР со специфичными праймерами для гена *CHS1*.



**Рис. 2.** Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *ToxA* изученных и референсных штаммов *P. tritici-repentis*. Красным выделен инсерционный элемент PtrHr2 размером 170 пн, черным выделен повторяющийся мотив из 8 пн.



**Рис. 3.** Вторичная структура инсерционного элемента PtrHp2 в гене *ToxA* гриба *P. tritici-repentis*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мониторинг расового состава популяций *P. tritici-repentis* и присутствия специфичных генов-эффекторов в геноме отдельных штаммов гриба позволяет получать фундаментальные знания о микроэволюции популяций и молекулярно-генетических аспектах взаимоотношений в системе растение-хозяин — патоген [22].

Ранее нами при анализе популяций *P. tritici-repentis* были выявлены десять штаммов, у которых при проведении специфичной ПЦР гена *ToxA* получены продукты амплификации большего размера, чем ожидаемый [12]. Штаммы *P. tritici-repentis* с подобной аномалией гена *ToxA* были отмечены в популяции гриба из Казахстана, выделенной в 2017 г. [11], а также другими исследователями для единичных штаммов *P. tritici-repentis* из России, Казахстана [23], Дании, Германии и Новой Зеландии [24]. Данные находки представляют особый интерес, поскольку свидетельствуют о наличии инсерции в амплифицируемом фрагменте гена *ToxA*, которая может влиять на функциональность гена.

В настоящем исследовании последовательности амплифицированных фрагментов гена *ToxA* у трех штаммов *P. tritici-repentis* из Казахстана оказались идентичны и в сравнении с последовательностью гена дикого типа включали инсерционный элемент длиной 170 пн, обозначенный PtrHp2, по аналогии с обнаруженным ранее в гене *ToxA* инсерционным элементом PtrHp1 [24]. Последовательность PtrHp2 не имеет гомологии с элементом PtrHp1 длиной 165 пн [24]. Кроме того, PtrHp2 расположен в районе экзона 2 гена *ToxA*, в отличие от

PtrHp1, который находится в области 3'UTR *ToxA* экзона 3 [24]. Интересно, что сайты инсерций оказались одинаковыми как для штаммов с элементом PtrHp1, так и для всех проанализированных нами штаммов с элементом PtrHp2, что свидетельствует об уникальности событий инсерции в гене *ToxA* после его горизонтального переноса в геном *P. tritici-repentis*. С другой стороны, оба элемента PtrHp1 и PtrHp2 имеют сходство в наличии взаимно комплементарных участков и вторичной структуре в виде «шпильки». Известно, что инсерции, образующие «шпильки», могут быть включены в механизмы сайленсинга генов, в которых они находятся [25].

Поиск гомологичных инсерционному элементу PtrHp2 последовательностей выявил 100%-ный идентичный участок 170 пн в некодирующей области гена *ToxB* (OP418007) штамма *P. tritici-repentis* SC29-1 из Канады [10]. Также выявлена полная идентичность инсерционного элемента PtrHp2 и фрагментов в некодирующей области генов *ToxB1* (AY425480) и *ToxB2* (AY425481) штамма *P. tritici-repentis* DW7 из США [26]. Гены *ToxB1* и *ToxB2* являются гомологами мульткопийного гена *ToxB*, контролирующего продукцию хлороз-индуцирующего белка-эффектора Ptr ToxB [26]. Локусы *ToxB1*, *ToxB2* и *ToxB3* имеют признаки укороченного ретротранспозона, т. е. содержат инвертированные повторы длиной 36 пн, фланкированные прямыми повторами длиной 6 пн [26]. Выявленная гомология всей последовательности инсерционного элемента с участками генов *ToxB1* и *ToxB2* позволяет предполагать, что механизм возникновения данной инсерции связан с укороченными ретротранспозонами, которые ассоциированы с локусами *ToxB* и могут стать причиной амплификации или делеции гена путем неравного кроссинговера с подобными последовательностями, расположенными в другом месте генома [26].

В геноме трех штаммов гриба *Pyrenophora teres* f. *maculata* из США, Новой Зеландии и Дании [27] на хромосоме 3 обнаружен фрагмент размером 159–165 пн, имеющий 94–100% сходства с последовательностью инсерционного элемента PtrHp2. Факты совпадения последовательности PtrHp2 в гене *ToxA* *P. tritici-repentis* с фрагментами генов у других видов грибов также свидетельствуют о его транспозонной природе.

Показано, что в процессе горизонтального переноса ген *ToxA* находился внутри транспозона ToxhAT размером 14 тпн, который, в свою очередь, расположен на участке генома размером 140–250 тпн, богатого транспозонами [28], а именно внутри транспозона “Starship”, имеющего размер 143 тпн [29]. Новый класс транспозабельных элементов, называемых Starships, относится к группе гигантских мобильных элементов размером более 50 тпн, которые участвуют в горизонтальных переносах

генов и играют особую роль в эволюции грибов [30, 31].

Шесть анализированных штаммов *P. tritici-repentis*, несущих ген *ToxA* с инсерционным элементом PtrHp2, были отнесены к авирулентной расе 4, которая не продуцирует ни один из известных эффекторов, и четыре штамма — к расе 5, которая продуцирует только Ptr ToxB. Данные результаты свидетельствуют о нарушении экспрессии гена *ToxA* в исследуемых штаммах гриба, что выражается в отсутствии симптомов некроза на листьях пшеницы сорта Glenlea, восприимчивого к эффектору Ptr ToxA.

Анализ конидиального потомства анализируемого штамма Каз20-С-12 с геном *ToxA*, содержащим PtrHp2, показал, что более 55% конидий не имеют искомого гена. Ранее нами была продемонстрирована гетерокариотичная природа штаммов *P. tritici-repentis* с использованием в качестве маркеров генов-эффекторов *ToxA* и *ToxB* [32]. Поскольку исходный штамм Каз20-С-12, по всей видимости, является гетерокариотом, то ядра, несущие ген *ToxA*, имеют одинаковые шансы с ядрами, утратившими этот ген, формировать новые конидии.

Таким образом, выявлены редкие события инсерции элемента PtrHp2, имеющего, по-видимому, транспозонную природу и способного формировать структуру шпильки с инвертированными повторами в гене *ToxA*. При этом элемент PtrHp2, открытый нами, локализован в кодирующей области *ToxA* и, по-видимому, нарушает работу гена, т. е. выполняет регуляторную или иную функцию. В то же время он не влияет на жизнеспособность изолятов, его несущих, и сохраняется при бесполом размножении. Для понимания возможной биологической роли инсерционных элементов в гене *ToxA* *P. tritici-repentis* необходимо проведение дополнительных исследований.

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. Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Yield losses in wheat from yellow spot: Comparison of estimates derived from single tillers and plots // Aust. J. Agric. Res. 1982. V. 33. P. 899–908.  
<https://doi.org/10.1071/AR9820899>
2. Bhathal J., Loughman R., Speijers J. Yield reduction in wheat in relation to leaf disease from yellow (tan) spot and *Septoria nodorum* blotch // Eur. J. Plant Pathol. 2003. V. 109. P. 435–443.  
<https://doi.org/10.1023/A:1024277420773>
3. Adhikari T.B., Bai J., Meinhardt S.W. et al. Tsn1-mediated host responses to *ToxA* from *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant Microbe Interact. 2009. V. 22. № 9. P. 1056–1068.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1056>
4. Tan K.C., Ferguson-Hunt M., Rybak K. et al. Quantitative variation in effector activity of *ToxA* isoforms from *Stagonospora nodorum* and *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant Microbe Interact. 2012. V. 25. P. 515–522.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-10-11-0273>
5. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z. et al. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 953–956.  
<https://doi.org/10.1038/ng1839>
6. Faris J.D., Liu Z., Xu S.S. Genetics of tan spot resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 2197–2217.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-013-2157-y>
7. Stukenbrock E.H., McDonald B.A. Geographical variation and positive diversifying selection in the host specific toxin Sn ToxA // Mol. Plant Pathol. 2007. V. 8. P. 321–332.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00396.x>
8. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А. Частота гена *ToxA* в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. № 5. С. 325–329.
9. Aboukhaddour R., Hafez M., McDonald M. et al. A revised nomenclature for *ToxA* haplotypes across multiple fungal species // Phytopathology. 2023. V. 113. № 7. P. 1180–1184.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-23-0017-SC>
10. Hafez M., Despins T., Nakajima K., Aboukhaddour R. Identification of a novel *ToxA* haplotype of *Pyrenophora tritici-repentis* from Japan // Phytopathology. 2022. V. 112. P. 1597–1602.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-22-0001-SC>
11. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования *ToxA* и *ToxB* // Вестн. защиты растений. 2019. № 1. С. 24–29.  
[https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-24-29](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29)
12. Мироненко Н.В., Ордина А.С., Коваленко Н.М., Зубко Н.Г. Расовый состав и изменчивость гена *ToxA* в географически отдаленных популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2024. Т. 58. № 3. С. 246–253.  
<https://doi.org/10.31857/S0026364824030064>
13. Михайлова Л.А., Гуляева Е.И., Кокорина Н.М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora*

- tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 1. С. 63–67.
14. Murray H.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
  15. Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification // Phytopathology. 2007. V. 97. P. 694–701. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0694>
  16. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
  17. Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A. et al. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
  18. Reuter J.S., Mathews D.H. RNAstructure: Software for RNA secondary structure prediction and analysis // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
  19. Lamari L., Gilbert J., Tekauz A. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada // Can. J. Plant Pathol. 1998. V. 20. P. 396–400. <https://doi.org/10.1080/07060669809500410>
  20. Lamari L., Strelkov S.E. The wheat – *Pyrenophora tritici-repentis* interaction: Progress towards an understanding of tan spot disease // Can. J. Plant Pathol. 2010. V. 32. P. 4–10. <https://doi.org/10.1080/07060661003594117>
  21. Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и Северо-Западе России: расовый состав и динамика вирулентности // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. Вып. 6. С. 393–400.
  22. Афанасенко О.С., Новожилов К.В. Проблемы рационального использования генетических ресурсов устойчивости растений к болезням // Экол. генетика. 2009. Т. 7. № 2. С. 38–42. <https://doi.org/10.17816/ecogen7238-43>
  23. Lepoint P., Renard M.E., Legreve A. et al. Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis* // Phytopathology. 2010. V. 100. P. 474–483. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-5-0474>
  24. Moolhuijzen P.M., See P.T., Oliver R.P., Moffat C.S. Genomic distribution of a novel *Pyrenophora tritici-repentis* *ToxA* insertion element // PLoS One. 2018. V. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206586>
  25. Chang S.S., Zhang Z., Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions // Annu. Rev. Microbiol. 2012. V. 66. P. 305–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150138>
  26. Martinez J.P., Oesch N.W., Ciuffetti L.M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, *ToxB*, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2004. V. 17. P. 467–474. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.5.467>
  27. Wyatt N.A., Friesen T.L. Four reference quality genome assemblies of *Pyrenophora teres* f. *maculata*: A resource for studying the barley spot form net blotch interaction // Mol. Plant Microbe Interact. 2021. V. 34. P. 135–139. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0228-A>
  28. McDonald M.C., Taranto A.P., Hill E. et al. Transposon-mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein *ToxA* between three fungal wheat pathogens // mBio. 2019. V. 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01515-19>
  29. Gourlie R., McDonald M., Hafez M. et al. The pangenome of the wheat pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* reveals novel transposons associated with necrotrophic effectors *ToxA* and *ToxB* // BMC Biol. 2022. V. 20. Art. 239. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01433-w>
  30. Gluck-Thaler E., Vogan A.A., Branco S. Giant mobile elements: Agents of multivariate phenotypic evolution in fungi // Cur. Biol. 2022. V. 32. № 5. P. R234–R236. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.020>
  31. Urquhart A.S., Vogan A.A., Gardiner D.M., Idnurm A. *Starships* are active eukaryotic transposable elements mobilized by a new family of tyrosine recombinases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2023. V. 120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214521120>
  32. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Генетический полиморфизм ядер штаммов *Pyrenophora tritici-repentis* по генам-эффекторам *ToxA* и *ToxB* // Генетика. 2021. Т. 57. № 5. С. 528–535. <https://doi.org/10.31857/S0016675821040093> (Mironenko N.V., Orina A.S., Kovalenko N.M. Nuclear genetic polymorphism in *Pyrenophora tritici-repentis* strains for *ToxA* and *ToxB* effector genes // Rus. J. Genetics. 2021. V. 57. P. 533–539. <https://doi.org/10.1134/S1022795421040098>)

**Novel *ToxA* Insertion Element in *Pyrenophora tritici-repentis*****N. V. Mironenko\*, A. S. Orina, N. M. Kovalenko***All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia**\*e-mail: nina2601mir@mail.ru*

*Pyrenophora tritici-repentis* is the causative agent of tan spot in wheat. Among the necrotrophic effectors produced by the fungus, the most studied is the necrosis-inducing protein toxin Ptr ToxA, encoded by the *ToxA* gene. Previously, we identified 10 strains of *P. tritici-repentis* from Kazakhstan and Russia, the amplified fragment of which with *ToxA*-specific primers turned out to be larger than expected. Sequencing of these fragments of three *P. tritici-repentis* strains revealed the presence of a 170 bp insertion element PtrHp2 located in exon 2 of the *ToxA* gene. The PtrHp2 sequence includes three pairs of mutually complementary regions of 16, 8 and 6 bp in length, forming a hairpin-type secondary structure. The inability of *P. tritici-repentis* strains possessing PtrHp2 in the *ToxA* gene to cause necrosis on the leaves of cv. Glenlea, which differentiates the presence of Ptr ToxA in the pathogen has been established. This fact indicates a violation of the expression of the mutant *ToxA* gene. However, the mutant *ToxA* gene with PtrHp2 is retained in 45% of the fungal mitotic progeny. The fragments homologous to the PtrHp2 are found in non-coding parts of *ToxB* gene and its homologues in *P. tritici-repentis* strains, as well as in the genomes of other fungi. This observation indicates the transposon nature of PtrHp2.

**Keywords:** tan spot, phytotoxin, necrotrophic effector, insertion element PtrHp2, gene *ToxA*.

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ТРАНЗИТНОГО ПЕПТИДА ФИТОИНСИНТАЗЫ ZMPSY1 СВЯЗАНА С БЕЛОЙ ОКРАСКОЙ ЭНДОСПЕРМА ЗЕРНА У ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

© 2024 г. Д. Х. Архестова<sup>1, 2</sup>, А. Д. Хаудов<sup>2</sup>, А. В. Щенникова<sup>1, \*</sup>, Е. З. Кочиева<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Институт сельского хозяйства — филиал Кабардино-Балкарского научного центра  
Российской академии наук, Нальчик, 360004 Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия  
\*e-mail: shchennikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 10.04.2024 г.

Желто-оранжевая окраска зерна кукурузы *Zea mays* L. определяется присутствием каротиноидов, первым ферментом пути биосинтеза которых является фитоинсинтаза PSY. В данной работе проведен анализ аллельных вариантов гена *ZmPSY1* у образцов желтозерных и белозерных инбредных линий кукурузы отечественной селекции. У четырех линий с разной окраской зерна амплифицированы и секвенированы полноразмерные кДНК *ZmPSY1* и охарактеризована их вариабельность. В последовательности кДНК *ZmPSY1* белозерных линий обнаружено четыре несинонимичных однонуклеотидных полиморфизма (SNP), которые приводят к замещениям остатков четырех аминокислот (L47I, W52S, E53D и A54V) в N-концевом транзитном пептиде, ответственном за пластидную локализацию фермента. Разработана система праймеров для ПЦР-идентификации типа аллеля *ZmPSY1* у образцов кукурузы. Тестирование праймеров на 44-х линиях кукурузы показало присутствие аллеля *ZmPSY1* дикого типа и отсутствие мутантного аллеля в геноме всех анализируемых 22 желтозерных линий; также выявили, что мутантный аллель *ZmPSY1* встречается с частотой 41%. Использование разработанной системы праймеров может иметь перспективы в селекции кукурузы с измененным содержанием каротиноидов в эндосперме зерна.

**Ключевые слова:** *Zea mays* L., инбредные линии кукурузы, биосинтез каротиноидов, фитоинсинтаза PSY1, полиморфизм, окраска эндосперма.

DOI: 10.31857/S0016675824090057 EDN: AEKKNK

Вариабельность растительного генома — это не только инструмент эволюционной адаптации и возникновения новых видов, но и значимый фактор влияния при селекции сельскохозяйственных растений. Среди наиболее важных признаков, по которым ведется селекция культурных растений, находятся характеристики, ассоциированные со стрессоустойчивостью, урожайностью и качеством продукции. Часто признаки разной направленности взаимосвязаны. Особенно это касается содержания различных метаболитов, определяющих вкусовые, питательные и/или диетические свойства продукта и одновременно являющихся средствами защиты растения от стрессовых факторов.

Все известные хозяйственно-ценные признаки определяются генетически, и их экспрессивность связана с вариабельностью конкретных геномных локусов и/или генов. Определение аллельных вариантов генов и доноров этих аллелей

способствует значительному ускорению процесса селекции улучшенных сортов агрокультур.

В качестве примера можно привести работы по поиску генов/локусов, сцепленных с хозяйственно-ценными признаками, с дальнейшей разработкой молекулярных маркеров на значимые аллельные варианты у важнейшей злаковой культуры — кукурузы *Zea mays* L. [1, 2]. Эта культура имеет самый высокий генетический потенциал урожайности среди зерновых и выращивается в различных агроэкологических регионах мира как на зерно, так и на силос. Зерно кукурузы является источником крахмала (65–70%), белка (16.5%), масел (3–5%), клетчатки (3%), растворимых сахаров (до 2%), а также каротиноидов (провитамина А и других каротиноидов) [1, 2]. Кукуруза — теплолюбивое растение преимущественно короткого дня и подвержена негативному влиянию различных стрессовых факторов [3–5]. Соответственно ведется поиск

геномных локусов, мутаций и аллелей, которые сцеплены с качественными характеристиками зерна (включая содержание каротиноидов (в том числе провитамина А), зеинов, масел, амилопектинового крахмала и др.) и устойчивостью к патогенам и абиотическим стрессовым факторам.

На основе получаемых данных разрабатываются и используются в селекции молекулярные маркеры, ассоциированные с целевыми признаками у кукурузы. Так, выявлены аллельные варианты генов метаболизма крахмала *waxy*, *amylose extender1* и *sugary1*, которые приводят к значительному увеличению содержания амилозы в составе крахмала [6]. Охарактеризован плеiotропный эффект мутантного аллеля *opaque2* (*o2*), присутствие которого увеличивает содержание незаменимых аминокислот лизина и триптофана в белковой фракции эндосперма зерна, однако снижает урожайность и повышает восприимчивость к болезням [1, 2]. В рамках работ по стрессоустойчивости разработаны маркеры признаков резистентности к фузариозной гнили початков (*Fusarium verticillioides*) и стеблей (*F. graminearum*) [3, 4]. Определена дифференциальная экспрессия генов транскрипционных факторов семейства DREB2 у растения кукурузы в ответ на воздействие различных абиотических факторов [5].

Другое современное направление в селекции кукурузы — увеличение содержания в эндосперме зерна каротиноидов, в том числе провитамина А ( $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин и  $\beta$ -криптоксантин), количество которого у большинства желтозерных сортов/линий кукурузы в 10 раз меньше по сравнению с целевым уровнем (в рамках существующей программы биофортификации) [1, 2]. Выявлены аллельные варианты генов ликопин- $\epsilon$ -циклазы (*LCYE*) и  $\beta$ -каротингидроксилазы 1 (*crtRBI*), влияющие на концентрацию  $\beta$ -каротина. Маркеры, сцепленные с такими аллелями, способствуют выявлению доноров среди образцов кукурузы и ускорению селекции на повышенное содержание провитамина А в зерне. Более того, известны успешные попытки пирамидирования — объединения при отборе признаков увеличения количества провитамина А и незаменимых аминокислот лизина и триптофана в зерне [1, 2].

От присутствия и состава каротиноидов зависит окраска зерна. Обогащение эндосперма зерна зеаксантином или лютеином приводит соответственно к оранжевой или желтой окраске, в то время как отсутствие каротиноидов или только цветных каротиноидов — к белой окраске [7–9]. Хотя из-за дефицита каротиноидов в зерне пищевая ценность сортов белозерной кукурузы считается ниже, чем желтозерной, по другим качествам различий практически не выявлено. При этом именно мука и крупа белозерных сортов являются необходимым компонентом некоторых продуктов (чипсы, лепешки)

и основой многих национальных блюд, особенно американской, мексиканской и кавказской кухни.

В связи с этим наметилась тенденция к увеличению сортимента и селекции сортов с различным содержанием каротиноидов (и соответственно различной окраской зерна). Для этого проводится анализ варибельности генов каротиногенеза. Синтез каротиноидов начинается с активации гена фитинсинтазы *PSY* и образования предшественника всех каротиноидов — 15-*цис*-фитоина [10]. Показано, что белая окраска зерна связана с различными мутациями в последовательности геномного локуса, содержащего ген *ZmPSY1*, которые приводят к дефициту каротиноидов в эндосперме, но не в зародыше [7, 11, 12]. К примеру, рецессивный мутантный аллель гена *ZmPSY1* — *yellow endosperm 1* (*y1*) оказывает упомянутый эффект на зерно, будучи и в гетерозиготном состоянии: эндосперм накапливает каротиноиды, но в незначительном количестве в сравнении с желтым и оранжевым зерном [9, 12, 13].

В настоящей работе были идентифицированы последовательности гомологов гена *ZmPSY1* у четырех инбредных линий кукурузы отечественной селекции, контрастных по окраске зерна (белая и желтая). Проведенное структурное сравнение выявило полиморфный участок в экзоне I, различающий белозерные и желтозерные образцы. Соответствие аллельных вариантов окраске зерна было протестировано на 44 инбредных линиях кукурузы, включающих белозерные и желтозерные образцы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали образцы 44 инбредных линий кукурузы отечественной селекции (ООО ИПА “Отбор”, Институт сельского хозяйства (ИСХ) КБНЦ РАН (КБР), ВИР (С.-Петербург)), 22 из которых белозерные и 22 — желтозерные (табл. 1). Зерна урожая 2020 г. (все 44 образца) проращивали в увлажненной почве и растили до стадии 3–4 листа в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь — 16 ч/8 ч, 22 °С/16 °С; освещенность 190 мкМ/(м<sup>2</sup>с)).

Из 50–100 мг листовой ткани проростков, предварительно растертой в жидком азоте, выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия) с последующей очисткой от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия). Полученные препараты РНК использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. Концентрацию РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью соответствующих

реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Кодирующие последовательности гена *Zm-PSY1* амплифицировали с помощью ПЦР на препаратах кДНК двух белозерных и двух желтозерных образцов. Специфичные праймеры (forward 5'-tggtctgctgactgggtctca-3'; reverse 5'-aacaacaattcaccaggtgtgc-3') подбирали на основе данных Генбанков NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MaizeGDB (<https://maizegdb.org/>). ПЦР проводили в следующих условиях: предварительная денатурация (95°C – 5 мин), амплификация в течение 35 циклов (95°C – 60 с, 60°C – 60 с, 72°C – 90 с), финальная достройка фрагментов (72°C – 5 мин). Ампликоны (ожидаемый размер 1419 пн) секвенировали с использованием тех же праймеров на ABI Prism 3730 DNA Analyzer (ЦКП Биотехнология РАН).

Для ПЦР-амплификации полиморфного участка последовательности кДНК *ZmPSY1* с разработанными праймерами использовали следующую программу: предварительная денатурация (15 мин при 95°C), 35 циклов (99°C – 45 с, 62°C – 45 с, 72°C – 45 с) и финальная достройка фрагментов (72°C – 2 мин).

Сравнительное выравнивание последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.26 (<https://www.megasoftware.net/>). Транзитный и сигнальный пептиды, консервативные домены и мотивы в белках определяли с помощью SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>), NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), а также литературных данных. Влияние замещений аминокислот на структуру белка предсказывали, используя PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>; default threshold – –2.5).

Суммарное количество каротиноидов (мкг/г сырого веса) определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах, полученных из ~0.5 г предварительно измельченной в жидком азоте ткани эндосперма зерна белозерного и желтозерного образцов, согласно [14]. Спектры поглощения регистрировали с помощью Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

Часть оборудования для данного исследования была обеспечена Программой развития МГУ им. М. В. Ломоносова (ПРМ-10) (комплект оборудования для геномных исследований).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления возможных SNP в последовательности гена *ZmPSY1*, связанных с биосинтезом каротиноидов в эндосперме зерна, в работе были использованы инбредные линии кукурузы с белой и желтой/оранжевой окрасками зерна (табл. 1).

Поскольку желтый и оранжевый эндосперм накапливает в 5–100 раз больше каротиноидов, чем белый [8, 9], мы предварительно сравнили содержание каротиноидов в эндосперме желтого (образец 2452-2) и белого (6097-1) зерна. В результате было подтверждено почти полное отсутствие каротиноидов у белозерного образца и в то же время их присутствие в количестве  $34.6 \pm 2.4$  мкг/г сырого веса у желтозерного образца.

### Идентификация и структурный анализ кодирующей последовательности гена *ZmPSY1* у белозерных и желтозерных инбредных линий кукурузы

С использованием доступных геномных данных кукурузы *Z. mays* spp. *mays* var. B73 была извлечена последовательность гена фитоинсинтазы *ZmPSY1* (другие названия *y1*, *pb1*; идентификаторы – LOC100136882, GRMZM2G300348, Zm00001eb271860). Ген локализован на хромосоме 6 в позиции 91643180..91646525 (по текущей версии сборки генома Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0; NCBI) или 82179486..82185345/85060410..85065755 (предыдущие версии сборки; MaizeGDB). На основе последовательности мРНК гена были подобраны праймеры для амплификации и секвенирования полной кДНК.

Кодирующая последовательность *ZmPSY1* была определена у двух желтозерных (2452-2, 5580-1) и двух белозерных (5254-3, 6097-1) инбредных линий кукурузы. Было показано, что кДНК гена у всех четырех образцов одинакова по длине (1233 пн). Последовательности кодируемых белков-гомологов (410 ао) содержат N-концевой транзитный пептид (в положении 1–62 ао, с сайтом отщепления V61/Y62, согласно UniProt), ответственный за пластидную локализацию фитоинсинтазы, а также консервативный домен head-to-head (HH)-IPPS (в положении 69–402 или 63–410 ао, согласно NCBI-CDD или UniProt). Присутствие сигнального пептида, определяющего транслокацию белка в пластиды и отщепляемого после прохождения мембраны оргanelл, было маловероятно (согласно SignalPeptide). Однако по версии [15] сигнальный пептид соответствует участку 1–19 ао на N-конце фермента и инвариантен между образцами (рис. 1).

В последовательности гомологов *ZmPSY1* были также идентифицированы два высоко консервативных консенсуса – скваленсинтазный (SQS) и фитоинсинтазный (PSY) (по [15]), подтверждающих функциональную принадлежность анализируемых белков. У четырех тестируемых образцов кукурузы консенсус SQS (CYVAGTVGLMSVPVM, положение 238–253 ао) содержал одно замещение ао – G243A (у желтозерного образца 2452-2), а PSY (GIANQLTNILRDVGEDARRGRIYLPQ, положение 274–299 ао) имел один полиморфизм – G274R (у белозерного образца 6097-1). Участки YAKTF

Таблица 1. Инбредные линии кукурузы, использованные в работе

| №  | Линия     | Окраска эндосперма зерна      | Аллель <i>ZmPSY1</i><br>дикого типа | Аллель <i>ZmPSY1</i><br>мутантного типа |
|----|-----------|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1  | МБК*      | Белая                         |                                     | +                                       |
| 2  | КБЗ*      | Белая                         |                                     | +                                       |
| 3  | 5740*     | Белая с красными<br>полосками | +                                   |                                         |
| 4  | 5254-1*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 5  | 6614-1*** | Белая                         | +                                   |                                         |
| 6  | 6063-1*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 7  | 6758-1*** | Белая                         | +                                   |                                         |
| 8  | 6349-1*** | Белая                         | +                                   |                                         |
| 9  | 5320-3*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 10 | 6038-1*** | Белая                         | +                                   |                                         |
| 11 | 5138-1*** | Белая                         | +                                   |                                         |
| 12 | 5254-3*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 13 | 5320-2*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 14 | 6097-1*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 15 | 5320-4*** | Белая                         |                                     | +                                       |
| 16 | К-5933**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 17 | К-6734**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 18 | К-6705**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 19 | К-6696**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 20 | К-6709**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 21 | К-5935**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 22 | К-5914**  | Белая                         | +                                   |                                         |
| 23 | 5676*     | Светло-желтая                 | +                                   |                                         |
| 24 | 1616*     | Светло-желтая                 | +                                   |                                         |
| 25 | 5675*     | Светло-желтая                 | +                                   |                                         |
| 26 | 5666*     | Матовая светло-желтая         | +                                   |                                         |
| 27 | 5739*     | Матово-желтая                 | +                                   |                                         |
| 28 | 5692*     | Матово-желтая                 | +                                   |                                         |
| 29 | 5696*     | Желтая                        | +                                   |                                         |

Таблица 1. Окончание.

| №  | Линия     | Окраска эндосперма зерна  | Аллель <i>ZmPSY1</i> дикого типа | Аллель <i>ZmPSY1</i> мутантного типа |
|----|-----------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 30 | 5683*     | Желтая                    | +                                |                                      |
| 31 | 5684*     | Желтая                    | +                                |                                      |
| 32 | 5694*     | Желтая                    | +                                |                                      |
| 33 | 5674*     | Желтая                    | +                                |                                      |
| 34 | 5580-1*** | Желтая                    | +                                |                                      |
| 35 | 2452-2*** | Желтая с красным кончиком | +                                |                                      |
| 36 | 1543*     | Насыщенно-желтая          | +                                |                                      |
| 37 | 5690*     | Насыщенно-желтая          | +                                |                                      |
| 38 | 6339-1*** | Ярко-желтая               | +                                |                                      |
| 39 | 5671*     | Темно-желтая              | +                                |                                      |
| 40 | 5677*     | Оранжевая                 | +                                |                                      |
| 41 | 5681*     | Оранжевая                 | +                                |                                      |
| 42 | 5272-6*** | Оранжевая                 | +                                |                                      |
| 43 | 2138***   | Оранжевая                 | +                                |                                      |
| 44 | 5687*     | Оранжевая                 | +                                |                                      |

Примечание. Окраска зерна определялась оригинаторами инбредных линий: \*ООО ИПА «Отбор»; \*\*ВИР им. Н.И. Вавилова; \*\*\*ИСХ КБНЦ РАН.

(129–133 ао) и RAYV (379–382 ао), ограничивающие каталитически активный сайт, у гомологов были идентичны (рис. 1, б).

Выравнивание идентифицированных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей в сравнении с кДНК *ZmPSY1* и соответствующим белком *Z. mays* var. B73 выявило высокий уровень консерватизма. Всего было обнаружено 19 SNPs, восемь из которых были специфичны для обоих белозерных образцов (g114→а, c139→а, g155→с, c161→t, t162→с, t168→с, c183→а, a798→g) (рис. 1, а). Оставшиеся SNPs были характерны для индивидуальных образцов: 6097-1 (c529→а, t753→а, a769→t, g819→а, g852→t), 2452-2 (g728→с), 5254-3 (a769→с, t811→с, g820→а, g852→с) и 2452-2/5580-1 (c1031→а).

В результате несинонимичных SNPs в последовательности кодируемых гомологов *ZmPSY1* произошло замещение остатков восьми аминокислот (рис. 1, б). Четыре нейтральных (согласно PROVEAN) замещения L47I, W52S, E53D и A54V присутствовали только у анализируемых белозерных образцов кукурузы. Другие замещения были специфичны для одной желтозерной линии 2452-2

(G243A; радикальное), белозерного образца 5254-3 (нейтральное T257P и радикальное G274R) и двух желтозерных линий 2452-2 и 5580-1 (T344N; нейтральное). Радикальное замещение G243A в середине консенсуса SQS (рис. 1, б), судя по сохранению желтой окраски зерна, не повлияло на синтез каротиноидов.

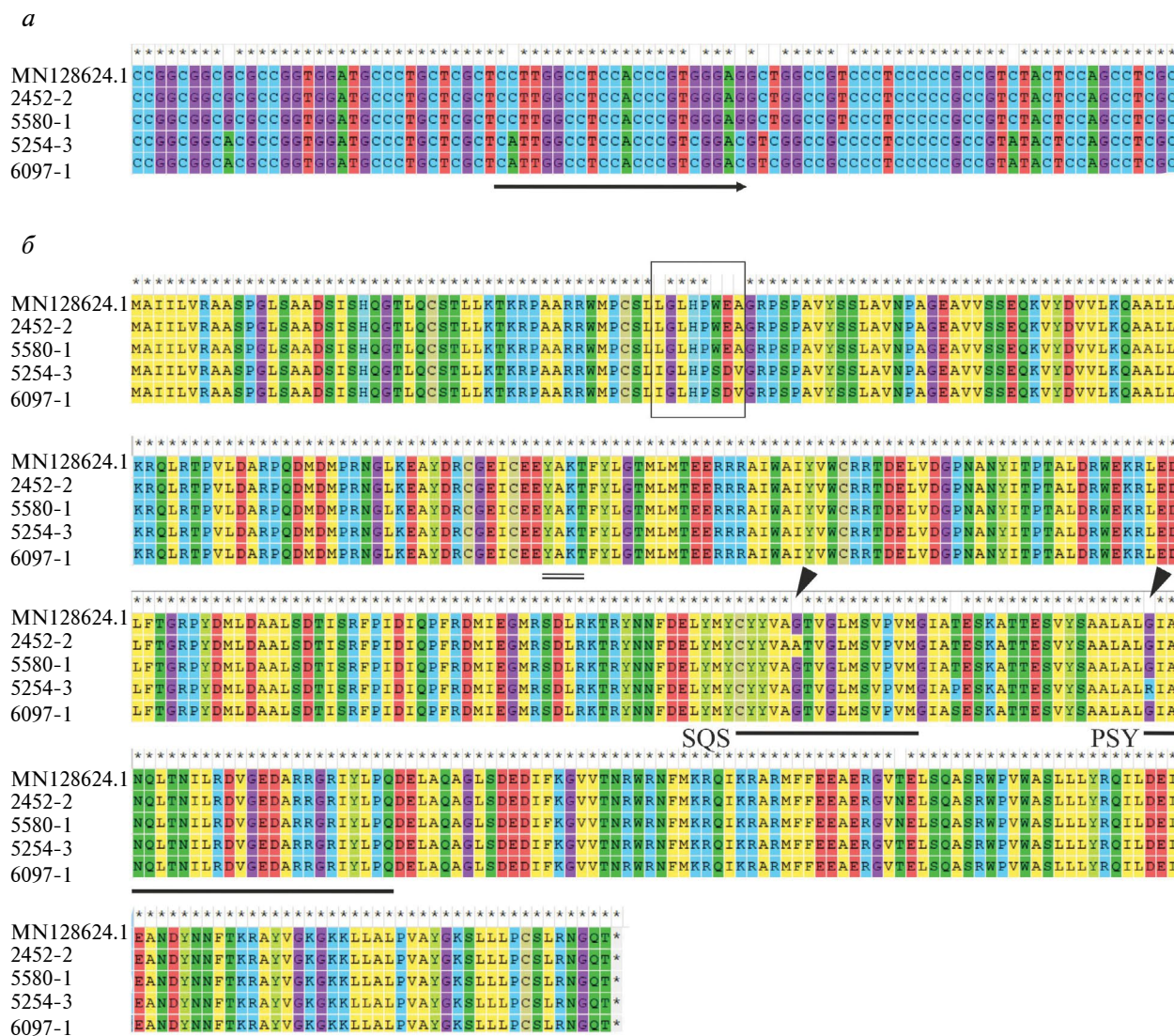
Несмотря на нейтральный статус замещения треонина на пролин T257P у белозерного образца 5254-3 (рис. 1, б), данный полиморфизм (или его вариант T257S) ранее охарактеризован как сцепленный с внутриклеточной локализацией *ZmPSY1* у 70% тестируемых белозерных линий [16]. Присутствие Pro-257 в сочетании с Asn-168 меняет не только локализацию *ZmPSY1*, но и морфологию 30% пластид [16]. Аллель Y1, который связывают с желтой окраской эндосперма, в 99% кодирует белок с Thr-257 в сочетании с Asn-168 [7, 15]. Можно предположить, что присутствие Pro-257/Asn-168 в последовательности *ZmPSY1* в нашем исследовании может быть связано с белой окраской эндосперма у образца 5254-3. Интересно, что данный образец содержал и специфичное ему радикальное

замещение G274R, которое соответствовало первому остатку консенсуса PSY (рис. 1, б). Ранее данный полиморфизм описан не был, но также может быть связан с белой окраской зерна у линии 5254-3.

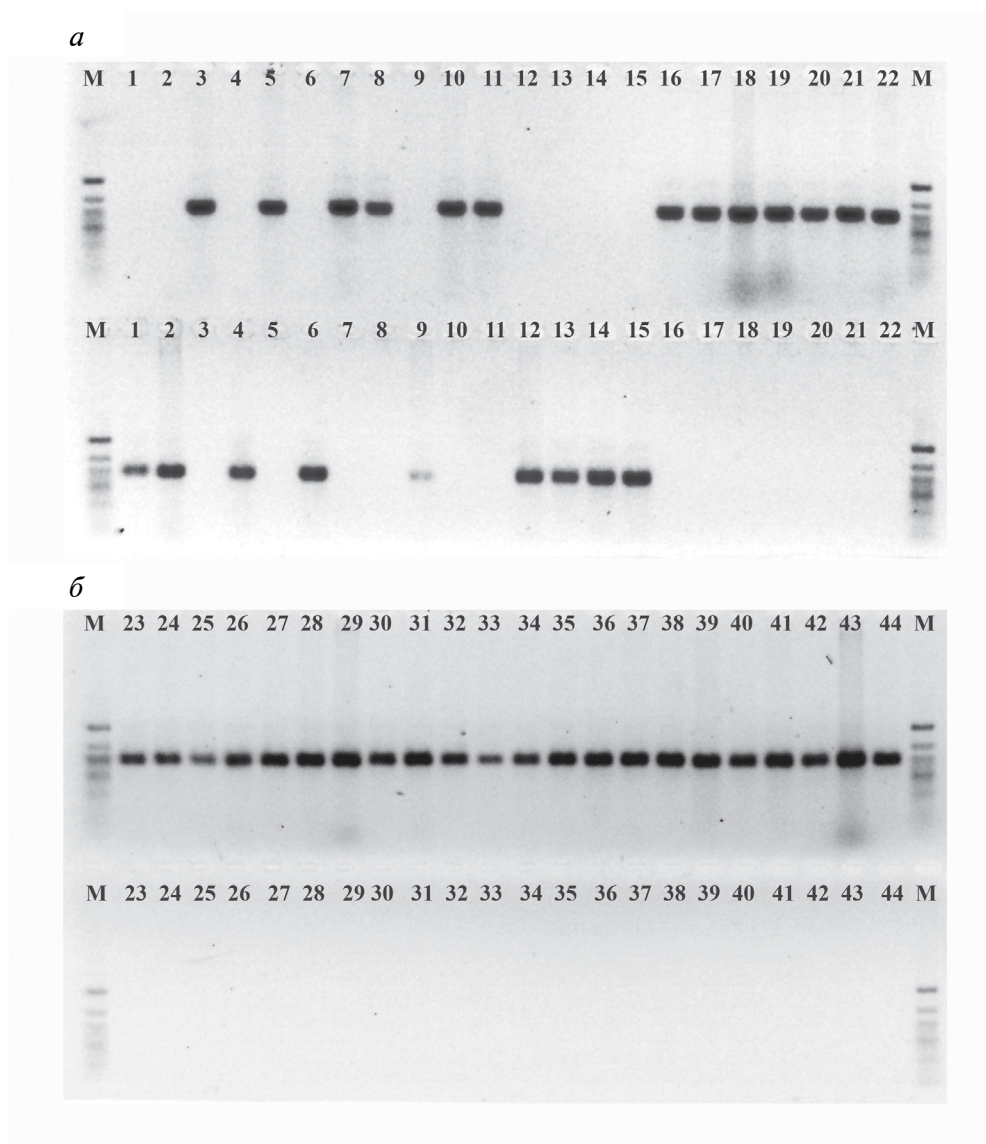
Заметим, что в работе [16] авторами также обнаружены различия в последовательности транзитного пептида в положениях с 52 по 55. Однако данные в статье не приведены, поскольку транзитный пептид процессируется после импорта в хлоропласты и не должен влиять на активность фермента [16]. По всей вероятности, речь шла о замещениях

W52S, E53D и A54V, которые были обнаружены нами в гомологах ZmPSY1 обоих анализируемых белозерных образцов (рис. 1, б).

Мы предположили, что замещения L47I, W52S, E53D и A54V могут быть сцеплены с белой окраской эндосперма зерна, хотя их нейтральный статус не предполагает каких-либо существенных нарушений фолдинга белка. Однако локализация замещений в С-концевой части транзитного пептида могла повлиять на корректность пластидной локализации фермента, а именно на его связывание с



**Рис. 1.** Выравнивание участка кДНК *ZmPSY1* (а) и аминокислотной последовательности гомологов *ZmPSY1* (б) у двух желтозерных (2452-2, 5580-1) и двух белозерных (5254-3, 6097-1) инбредных линий кукурузы в сравнении с референсом *Z. mays* var. B73 (LOC100136882; MN128624.1). Стрелкой указан участок нуклеотидной последовательности, выбранный для прямого праймера (на анализ аллельного варианта гена *ZmPSY1*). В аминокислотной последовательности выделен рамкой полиморфный участок транзитного пептида, содержащий замещения ао L47I, W52S, E53D и A54V, подчеркнуты консенсусы SQS и PSY (сплошными линиями) и участки YAKTF и RAYV, ограничивающие каталитически активный сайт (двойными линиями), а также указаны радикальные замещения ао (стрелками).



**Рис. 2.** Электрофорез в 2.5%-ном агарозном геле продуктов (394 пн) ПЦР-амплификации на геномной ДНК 44 инбредных линий кукурузы с праймерами, разработанными для аллелей дикого (PSY155R/PSY155FG; верх каждого геля) и мутантного (PSY155R/PSY155FC; низ каждого геля) типа. а – белозерные линии (1–22). У девяти образцов обнаружен аллель *ZmPSY1* дикого типа, и 13 образцов содержали мутантный аллель; б – желтозерные линии (23–44). У всех 22 образцов показано присутствие аллельного варианта *ZmPSY1* дикого типа. Нанесение образцов соответствует порядковым номерам линий в таб. 1; М – маркер длин ДНК GeneRuler Low Range (первые четыре полосы сверху вниз: 700, 500, 400, 300 пн).

белками, узнающими транзитный пептид и участвующими в переносе фитоинсинтазы в пластиды.

При каротиногенезе происходит транслокация фитоинсинтазы в пластоглобулы пластид с помощью транзитного пептида, что показано на примере анализа работы транзитного пептида изофермента PSY2 в хлоропластах риса (*Oryza sativa* L.) [17]. В запасяющих органах происходит преобразование хлоропластов в хромопласты и значительное увеличение количества белка PSY1 в пластоглобулах, что показано на примере плодов томата

(*Solanum lycopersicum* L.) [18]. Поэтому отсутствие *ZmPSY1* в пластоглобулах эндосперма зерна из-за замещений ао в транзитном пептиде может привести к отсутствию каротиноидов. При этом в фотосинтезирующей ткани или зародыше зерна данный эффект может нивелироваться активностью хлоропласт-специфичного изофермента *ZmPSY2*, геномный локус которого не содержит известных замещений ао, сцепленных с различиями (белый vs. желтый) в окраске эндосперма [7].

*Разработка и тестирование праймеров  
на присутствие аллельных вариантов  
ZmPSY1 дикого и мутантного типов*

С учетом замещений ао, специфичных для белозерных образцов кукурузы, была разработана система из трех праймеров. Последовательность обратного праймера (PSY155R: 5'-gccgctcctctgtcatcaac-3', положение 512–531 в последовательности гена) была общей для аллеля дикого типа (желтозерные образцы) и мутантного аллеля (белозерные образцы). Последовательности двух прямых праймеров основывались на полиморфном участке кДНК PSY1 желтозерных (PSY155FG: 5'-ccttggcctccaccg-3', положение 138–155 в последовательности гена) и белозерных (PSY155FC: 5'-cattggcctccaccg-3', 138–155) образцов (рис. 1, а). Ожидаемый размер ПЦР-фрагмента – 394 пн. При амплификации с парами праймеров PSY155R/PSY155FG и PSY155R/PSY155FC на геномной ДНК растений кукурузы будет нарабатываться фрагмент, соответствующий аллелю дикого типа или мутантному аллелю ZmPSY1 соответственно.

Анализ аллельных вариантов с использованием разработанных праймеров проводили на образцах 44 линий (22 белозерных и 22 желтозерных) кукурузы (табл. 1). В результате было показано, что фрагмент, соответствующий мутантному аллелю, нарабатывается у девяти образцов из 22 тестируемых белозерных линий; остальные 13 показывают присутствие в геноме аллеля дикого типа (рис. 2, а). У всех тестируемых желтозерных линий амплифицировался фрагмент аллеля дикого типа (рис. 2, б). Секвенирование ампликонов подтвердило, что амплифицируются ожидаемые варианты последовательности ZmPSY1.

Отдельно отметим, что белок ZmPSY1 белозерного образца 5254-3, который содержит выше дискутируемые замещения T257P и G274R (рис. 1, б), ассоциированные согласно [16] с белой окраской эндосперма, одновременно характеризуется мутантным типом аллеля (рис. 2, а). В связи с этим белая окраска зерна линии 5254-3 может быть связана как с тестируемыми нами замещениями ао в транзитном пептиде, так и с замещениями T257P и G274R.

Таким образом, идентифицированный и рассматриваемый в настоящем исследовании ранее не описанный мутантный аллель ZmPSY1 был характерен только для белозерных линий кукурузы, что свидетельствует о его возможной связи с дефицитом каротиноидов в эндосперме зерна. Присутствие аллеля дикого (по целевому участку кДНК/транзитному пептиду) типа у половины тестируемых белозерных линий может объясняться наличием в геномном локусе ZmPSY1 данных образцов

других замещений ао, сцепленных с дефицитом каротиноидов в зерне [7, 16].

Работа выполнена при финансовой поддержке подпрограммы ФНТП «Развитие селекции и семеноводства кукурузы».

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 об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandrasekharan N., Ramanathan N., Pukalenth B. et al. Development of  $\beta$ -carotene, lysine, and tryptophan-rich maize (*Zea mays*) inbreds through marker-assisted gene pyramiding // Sci. Rep. 2022. V. 12(1). 8551. doi: 10.1038/s41598-022-11585-y
2. Singh J., Sharma S., Kaur A. et al. Marker-assisted pyramiding of lycopene- $\epsilon$ -cyclase,  $\beta$ -carotene hydroxylase1 and opaque2 genes for development of biofortified maize hybrids // Sci. Rep. 2021. V. 11(1). 12642. doi: 10.1038/s41598-021-92010-8
3. Abdel-Rahman M.M., Bayoumi S.R., Barakat M.N. Identification of molecular markers linked to *Fusarium* ear rot genes in maize plants *Zea mays* L. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2016. V. 30(4). P. 692–699. doi: 10.1080/13102818.2016.1181987
4. Yang D.E., Zhang C.L., Zhang D.S. et al. Genetic analysis and molecular mapping of maize (*Zea mays* L.) stalk rot resistant gene Rfg1 // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108(4). P. 706–711. doi: 10.1007/s00122-003-1466-y
5. Filyushin M.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Zm-DREB2.9 gene in maize (*Zea mays* L.): genome-wide identification, characterization, expression, and stress response // Plants (Basel). 2022. V. 11(22). doi: 10.3390/plants11223060
6. Yu J.K., Moon Y.S. Corn starch: quality and quantity improvement for industrial uses // Plants (Basel). 2021. V. 11(1). doi: 10.3390/plants11010092
7. Palaisa K.A., Morgante M., Williams M. et al. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci // Plant Cell. 2003. V. 15(8). P. 1795–1806. doi: 10.1105/tpc.012526
8. Ranilla L.G., Zolla G., Afaray-Carazas A. et al. Integrated metabolite analysis and health-relevant in vitro functionality of white, red, and orange maize (*Zea mays* L.) from the Peruvian Andean race Cabanita at

- different maturity stages // *Front. Nutr.* 2023. V. 10. doi: 10.3389/fnut.2023.1132228
9. Burt A.J., Grainger C.M., Smid M.P. et al. Allele mining of exotic maize germplasm to enhance macular carotenoids // *Crop Science*. 2011. V. 51(3). P. 991–1004. doi: 10.2135/cropsci2010.06.0335
  10. Sierra J., McQuinn R.P., Leon P. The role of carotenoids as a source of retrograde signals: Impact on plant development and stress responses // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73(21). P. 7139–7154. doi: 10.1093/jxb/erac292
  11. Buckner B., Kelson T.L., Robertson D.S. Cloning of the *yl* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids // *Plant Cell*. 1990. V. 2(9). P. 867–876. doi: 10.1105/tpc.2.9.867
  12. Buckner B., Miguel P.S., Janick-Buckner D. et al. The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase // *Genetics*. 1996. V. 143(1). P. 479–488. doi: 10.1093/genetics/143.1.479
  13. Egesel C.E.M., Wong J.C., Lambert R.J. et al. Gene dosage effects on carotenoid concentration in maize grain // *Maydica*. 2003. V. 48(3). P. 183–190.
  14. Филишин М.А., Джос Е.А., Шенникова А.В. и др. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов // *Физиология растений*. 2020. Т. 67. С. 644–653. doi: 10.31857/S0015330320050048
  15. Fu Z., Yan J., Zheng Y. et al. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSY1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 120(4). P. 709–720. doi: 10.1007/s00122-009-1188-x
  16. Shumskaya M., Bradbury L.M., Monaco R.R. et al. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 3725–3741. doi: 10.1105/tpc.112.10417
  17. You M.K., Kim J.H., Lee Y.J. et al. Plastoglobule-targeting competence of a putative transit peptide sequence from rice phytoene synthase 2 in plastids // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 18(1). doi: 10.3390/ijms18010018
  18. Zita W., Bressoud S., Glauser G. et al. Chromoplast plastoglobules recruit the carotenoid biosynthetic pathway and contribute to carotenoid accumulation during tomato fruit maturation // *PLoS One*. 2022. V. 17(12). doi: 10.1371/journal.pone.0277774

## Polymorphisms in the Transit Peptide of Phytoene Synthase *ZmPSY1* Link to the White Color of Grain Endosperm in Maize Inbred Lines

D. Kh. Arkhestova<sup>1,2</sup>, A. D. Khaudov<sup>2</sup>, A. V. Shchennikova<sup>1,\*</sup>, E. Z. Kochieva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow 119071

<sup>2</sup>Institute of Agriculture - branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Nalchik 360004

<sup>3</sup>Lomonosov, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: shchennikova@yandex.ru

The yellow and orange color of *Zea mays* L. grain is determined by the presence of carotenoids, the first enzyme of the biosynthesis pathway of which is phytoene synthase PSY. In this study, we analyzed allelic variants of the *ZmPSY1* gene in accessions of yellow-grain and white-grain maize inbred lines of domestic selection. In four lines with different grain colors, full-length *ZmPSY1* cDNAs were amplified and sequenced, and their variability was characterized. In the cDNA sequence of *ZmPSY1* from white-grain lines, nonsynonymous SNPs were found that lead to substitutions of four amino acid residues (L47I, W52S, E53D and A54V) in the N-terminal transit peptide responsible for the plastid localization of the enzyme. A primer system has been developed for PCR identification of the *ZmPSY1* allele type in maize accessions. Testing of primers on 44 maize lines showed the presence of the wild-type *ZmPSY1* allele and the absence of the mutant allele in the genome of all 22 yellow-grain lines analyzed. The mutant *ZmPSY1* allele was detected in the genome of 41% of the 22 tested white-grain lines. The use of the developed primer system may be promising in the selection of corn with altered carotenoid content in the grain endosperm.

**Keywords:** *Zea mays* L., maize inbred lines, biosynthesis of carotenoids, phytoene synthase PSY1, polymorphism, endosperm color.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА *Juniperus communis* var. *oblonga* Hort. ex Loudon. В КАВКАЗСКОМ РЕГИОНЕ РОССИИ, ОСНОВАННАЯ НА nSSR-МАРКЕРАХ

© 2024 г. Е. В. Хантемирова\*

Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук,  
Екатеринбург, 620144 Россия

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

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Принята к публикации 03.05.2024 г.

Десять популяций кавказского можжевельника *J. communis* var. *oblonga* были проанализированы с помощью семи ядерных микросателлитных локусов (nSSR), чтобы сделать выводы о путях миграции и генетических связях с популяциями северной части ареала. Эти новые данные были объединены с ранее полученными из основного евроазиатского ареала. Результаты анализа nSSR подтверждают данные по структуре хпДНК *J. communis* var. *oblonga* о существовании глубокого расхождения между популяциями восточной части Большого Кавказа и популяциями основного ареала, что, вероятно, связано с длительной изоляцией можжевельника в этой части Кавказа. В то же время результаты свидетельствуют о существовании у можжевельника генного потока из основного ареала в сторону Западного Кавказа, который был интенсивнее с семенами. Установившиеся в межледниковые периоды маршруты миграций перелетных птиц способствовали расселению семян на большие расстояния и контактам можжевельника основной части ареала с можжевельником западной части Кавказа, что отразилось на структуре изменчивости ядерной ДНК.

**Ключевые слова:** *J. communis* var. *oblonga*, ядерная ДНК, nSSR, генетическое разнообразие, Большой Кавказ.

DOI: 10.31857/S0016675824090062 EDN: AEBYZM

Разные виды древесных растений в Евразии по-разному реагировали на климатические изменения плейстоцена и голоцена. В период четвертичных оледенений ареалы широколиственных лесных видов Северной Евразии периодически сокращались с отступанием на юг и последующей реколонизацией в межледниковье [1, 2]. Эти миграции оставляли четкий генетический след в структуре изменчивости хлоропластного, митохондриального и ядерного геномов. Однако более холодостойкие таежные виды (береза, ива, ель, сосна), по-видимому, не полностью отступали в южные районы в неблагоприятные периоды и, возможно, сохраняли довольно обширные популяции вблизи ледниковых щитов [3–8]. Эти популяции могли расширять свои ареалы во время теплых стадий и обладать значительным потоком генов. Четкая филогеографическая структура у них отсутствует или имеет более комплексный и трудно интерпретируемый характер, относясь к эпохам более ранним, чем последний ледниковый максимум. Такие виды, как, например, *Pinus sylvestris* L., на большом протяжении своего ареала могут

иметь однородную генетическую структуру с низкой межпопуляционной изменчивостью [9].

Среди всех хвойных видов выделяется один уникальный вид, способный успешно справляться с климатическими изменениями благодаря разнообразию жизненных форм и ряду других свойств, выработавшихся в процессе эволюции.

Это можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis* L.) — самый молодой вид из семейства Cupressaceae, сформировавшийся в условиях прогрессивного похолодания планеты [10]. В отличие от своих теплолюбивых родственников, занимающих небольшие ареалы в семиаридных экотопах, этот вид смог широко расселиться по планете. Южная граница современного ареала можжевельника в Северной Евразии совпадает с границей ареала сосны обыкновенной, однако на север ареал можжевельника простирается значительно дальше сосны, вплоть до 70-й параллели, где он широко расселяется в тундрах, горах и на каменистых склонах. В благоприятных условиях он растет в виде прямоостоячего кустарника или даже деревца, на бедных

почвах и в суровых температурных условиях — в виде стланика, зимующего под снегом.

Вероятно, у *J. communis* не совсем отрегулированы гены апикального доминирования, он не запрограммирован четко на верхушечный рост так, как другие хвойные деревья. И хотя он не в силах конкурировать с другими быстро растущими хвойными и не способен образовывать столько же биомассы, как они, его способность к переходу в стелющую форму может играть отличную роль при климатических флуктуациях.

Помимо широкой экологической амплитуды и высокой морфологической пластичности можжевельник обладает также и эффективным способом рассеивания семян с помощью птиц и мелких млекопитающих, что позволяло ему не только переживать ледниковые периоды во множестве микро-рефугиумов, но и быстро расселяться в периоды потеплений.

Анализ изменчивости хлоропластной ДНК (хпДНК) *J. communis* в Евразии показал наличие одной большой однородной генетической группы на территории Европы, Урала и Сибири и двух изолированных групп в горах Центральной Азии и на Дальнем Востоке России [11]. Слабая подразделенность популяций можжевельника на основной части ареала косвенно указывает на значительный поток генов между этими популяциями и их общее происхождение из одного источника (возможно, это были Альпы) еще до последнего ледникового максимума. То есть лишь несколько гаплотипов были широко распространены в этой большой группе, в то время как чрезвычайно большое количество гаплотипов было ограничено отдельными популяциями. Это позволяет предположить существование микро-рефугиумов этого вида во время четвертичных оледенений. Этот факт вместе с необычно высоким внутривидовым разнообразием в северных популяциях можжевельника свидетельствуют о том, что в последний ледниковый максимум можжевельник выживал и, вероятно, даже процветал в высоких широтах в многочисленных перигляциальных микро-рефугиумах (cryptic refugium), которые являлись вторичными центрами реколонизации. Четвертичные колебания климата неоднократно приводили к возникновению обширных перигляциальных ландшафтов с высокой долей ксерофитной и арктоальпийской растительности, где, судя по пыльцевым остаткам, можжевельник играл не последнюю роль [12].

С помощью молекулярных маркеров не удалось обнаружить генетических отличий у разновидностей можжевельника, выделяемых по форме роста: прямостоячей *J. communis* L. var. *communis* (common juniper в англоязычной литературе) и стланиковой *J. communis* var. *saxatilis* Pall. (dwarf juniper там же), но при этом обнаружены статистически

значимые отличия по ряду морфологических и анатомических параметров хвои и преобладающей жизненной форме [13]. Видимо, обладая высокой полиморфностью, можжевельник обыкновенный существует одновременно в виде нескольких жизненных форм. Под действием отбора в разных экологических условиях начинает преобладать одна из них, в то же время постоянно существующий обмен генами между популяциями поддерживает генетическое единообразие на обширном ареале.

В то же время с помощью хлоропластных маркеров выявилась генетическая дифференциация горных популяций *J. communis*, локализованных на южной периферии ареала (горные системы Гималаев, Тибета, Тянь-Шаня, Алтай, Саян и Большого Кавказа). Все они, за исключением наиболее западных кавказских популяций, имели низкие показатели внутривидового разнообразия. Вероятно, популяции можжевельника в этой части ареала представляют собой древние дивергированные генетические линии, не вносившие вклад в реколонизацию Северной Евразии. Тем не менее их длительная историческая стабильность позволила им сохранить уникальный запас генетической изменчивости, изучение которой могло бы дать ответы на многие вопросы происхождения и расселения этого вида на евразийском континенте.

В европейской части Евразии особый интерес в этом отношении представляет территория Большого Кавказа, которая является самым южным форпостом для *J. communis*. Здесь он уже начинает замещаться другими более теплолюбивыми и засухоустойчивыми видами можжевельников, например *Juniperus deltoids* R.P. Adams. Систематика кавказского можжевельника очень запутана, он имеет множество синонимов в качестве вида, подвида и разновидности: *J. oblonga* M.-Bieb (= *J. albanica* Penzes, *J. communis* var. *caucasica* Endl., *J. communis* var. *oblonga* hort. ex Loudon., *J. communis* var. *saxatilis* Pall.) [14–16]. Н. Имханицкая [17] считает этот можжевельник подвидом обыкновенного: *J. communis* subsp. *oblonga* (Bieb) Galushko и выделяет еще два подвида по форме роста: низкий кустарник *J. communis* subsp. *hemisphaerica* C. Presl Nym. и стланик *J. communis* subsp. *pygmaea* (C. Koch) Imch. А. Фарджун [18] не признает выделения этого можжевельника даже в качестве разновидности. Р. Адамс, применив молекулярные методы (RAPD), также не внес ясности. Сначала он придает ему статус отдельного вида *J. oblonga* [19, 20], но в более поздних работах не обнаруживает дифференциации [21, 22]. В дальнейшем, используя другие методы, он все-таки находит основания для ограничения *J. communis* var. *oblonga* [23].

Наши исследования с помощью ядерных (аллозимы) и хлоропластных маркеров также подтвердили выделение этой разновидности [11, 24]. Эти выводы были далее дополнены с помощью

морфологического анализа [13]. У кавказского можжевельника обнаружено достоверное увеличение ширины и длины хвои, более длинный кончик хвои, две устьичные полосы, развитый проводящий пучок с большим количеством обкладочных клеток.

Однако эти методы выявили также значительную дифференциацию между популяциями этой разновидности на Кавказе. В то время как популяции восточной части Северного Кавказа были сильно дивергированы от остальных популяций *J. communis* по всем маркерам, популяции из западной части обнаруживали некоторые связи с можжевельником из основного европейского ареала. Например, наиболее западная в нашем исследовании популяция из района Сочи по ряду морфологических и генетических параметров оказалась близка к альпийским растениям. Остались неясными происхождение этих западных популяций и история их расселений. Ответить на эти вопросы нам не позволило, в частности, отсутствие выборок на большом географическом промежутке между Кавказом и Альпами.

В настоящем исследовании мы восполнили этот недостаток, собрав выборку *J. communis* с Балканского полуострова и дополнительные выборки с Кавказа. Мы сконцентрировались здесь на филогеографии *J. communis* var. *oblonga* на Северном Кавказе, этом уникальном географическом регионе, который благодаря своей геологической истории, климатическим особенностям и топографии, вероятно, с конца миоцена играл важную роль в сохранении и возникновении биологического разнообразия видов. Для изучения истории можжевельника обыкновенного на Северном Кавказе в десяти популяциях *J. communis* var. *oblonga* с помощью анализа семи ядерных микросателлитных локусов оценены уровень генетического разнообразия и дифференциации, сделаны выводы о путях его миграции и генетических связях с популяциями можжевельника северной части ареала. Эти новые данные были объединены с данными анализа nSSR по 24 популяциям *J. communis*, ранее полученными из основного евроазиатского ареала [25], и с данными по изменчивости хпДНК [11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Растительный материал для ДНК-анализа*

В настоящей работе для мультилокусного генетического анализа с помощью ядерных микросателлитов использовалась ДНК 149 образцов из десяти популяций *J. communis* var. *oblonga* из Северного Кавказа: три популяции из западной части, одна из центральной и семь из восточной части (табл. 1). Также исследовано девять образцов из

балканской популяции (Болгария). Каждый набор образцов содержал в среднем 16 случайно отобранных растений. Стратегия отбора выборок растений была разработана таким образом, чтобы избежать сбора особей, расположенных ближе 15 м друг от друга, что минимизировало сбор растений клонowego происхождения. Собранную хвою сушили в бумажных конвертах или хранили в силикагеле до выделения ДНК. Для некоторых видов анализа эти выборки объединялись с 363 образцами из 24 популяций *J. communis*, использованных в предыдущем исследовании [25].

### *Выделение ДНК и анализ nSSR-маркеров*

Геномную ДНК выделяли из высушенной хвои методом СТАВ согласно М. Devey et al. [26]. Качество и количество ДНК измеряли с помощью спектрофотометра.

В нашей предыдущей работе [25] для *J. communis* были отобраны семь nSSR, которые обеспечивали воспроизводимые фрагменты ожидаемых размеров с достаточным количеством полиморфизмов: *Jc16*, *Jc031*, *Jc032*, *Jc035*, *Jce01*, *Jce10* и *Jce13* [27, 28]. Из этих локусов был составлен мультиплекс с учетом температуры отжига праймеров, сочетания флуоресцентного красителя и длины продукта амплификации [25]. Этот же мультиплекс мы использовали и в настоящей работе для кавказского можжевельника. Условия ПЦР описаны в предыдущей работе. Электрофорез фрагментов проводили на капиллярном секвенаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия). Размеры аллелей определяли с помощью программы GENEMAPPER 1.95 (Soft Genetics, State College, Pennsylvania, США) сначала автоматически, а затем проверяли вручную.

### *Анализ данных*

Для каждой популяции с помощью программы GenAlex v 6.5 были посчитаны следующие параметры разнообразия: среднее число аллелей на локус ( $N_a$ ), индекс Шеннона ( $H$ ), наблюдаемая гетерозиготность ( $H_o$ ) и ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ ), коэффициент инбридинга ( $F$ ). Для изучения дифференциации популяций и филогеографической структуры использовали статистические программы, описанные в нашей предыдущей работе [25].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Дифференциация популяций *J. communis* в Евразии и Северной Америке по результатам анализа nSSR*

Для анализа генетической структуры всех 35 популяций можжевельника обыкновенного (24

**Таблица 1.** Показатели генетического разнообразия в 35 популяциях *J. communis* по результатам изменчивости nSSR-маркеров

| №                                                               | Популяция              | Широта/долгота     | Высота над ур. моря, м | <i>N</i> | <i>N<sub>a</sub></i> | <i>I</i> | <i>H<sub>o</sub></i> | <i>H<sub>e</sub></i> | <i>F</i> |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------------------|----------|
| <i>J. communis</i> var. <i>communis</i> , var. <i>saxatilis</i> |                        |                    |                        |          |                      |          |                      |                      |          |
| 1                                                               | Беларусь               | N 54°46'/E 26°49'  | 170                    | 16       | 7.14                 | 1.56     | 0.453                | 0.737                | 0.319    |
| 2                                                               | Эстония                | N 57°27'/E 24°52'  | 22                     | 16       | 8.43                 | 1.73     | 0.480                | 0.779                | 0.388    |
| 3                                                               | Упсала                 | N 59°53'/E 17°36'  | 21                     | 16       | 8.43                 | 1.67     | 0.507                | 0.756                | 0.310    |
| 4                                                               | Удмуртия               | N 57°31'/E 52°32'  | 150                    | 16       | 7.57                 | 1.58     | 0.472                | 0.708                | 0.270    |
| 5                                                               | Полевской              | N 56°25'/E 60°11'  | 403                    | 10       | 5.88                 | 1.45     | 0.440                | 0.723                | 0.307    |
| 6                                                               | Полярный Урал          | N 66°51'/E 65°20'  | 547                    | 16       | 8.27                 | 1.76     | 0.534                | 0.796                | 0.313    |
| 7                                                               | П-ов Ямал              | N 67°11'/E 71°15'  | 3                      | 16       | 8.71                 | 1.80     | 0.532                | 0.807                | 0.337    |
| 8                                                               | Мезень                 | N 65°18'/E 43°56'  | 22                     | 17       | 8.86                 | 1.75     | 0.423                | 0.760                | 0.467    |
| 9                                                               | Ергаки                 | N 53°08'/E 92°56'  | 1750                   | 15       | 6.0                  | 1.44     | 0.332                | 0.710                | 0.523    |
| 10                                                              | Зюраткуль, Южный Урал  | N 54°56'/E 59°11'  | 943                    | 16       | 7.14                 | 1.54     | 0.606                | 0.716                | 0.114    |
| 11                                                              | Алтай, оз. Телецкое    | N 51°46'/E 87°17'  | 790                    | 16       | 6.14                 | 1.39     | 0.428                | 0.691                | 0.311    |
| 12                                                              | Тянь-Шань, Киргизия    | N 42°35'/E 74°29'  | 2000                   | 16       | 5.57                 | 1.26     | 0.440                | 0.628                | 0.306    |
| 13                                                              | Тура                   | N 64°17'/E 100°17' | 353                    | 17       | 6.57                 | 1.51     | 0.316                | 0.730                | 0.563    |
| 14                                                              | Северо-Байкальск       | N 55°42'/E 109°04' | 536                    | 16       | 5.71                 | 1.32     | 0.414                | 0.640                | 0.322    |
| 15                                                              | Северный Тироль, Альпы | N 46°30'/E 14°45'  | 1759                   | 14       | 8.71                 | 1.75     | 0.519                | 0.790                | 0.319    |
| 16                                                              | Болгария, Балканы      | N 42°02'/E 24°42'  | 607                    | 9        | 3.71                 | 1.01     | 0.254                | 0.593                | 0.515    |
| 17                                                              | Горная Шория           | N 52°55'/E 88°00'  | 1570                   | 16       | 5.14                 | 1.33     | 0.459                | 0.693                | 0.314    |
| 18                                                              | Гималаи                | N 31°06'/E 77°10'  | 3300                   | 15       | 4.29                 | 1.01     | 0.332                | 0.537                | 0.324    |
| 19                                                              | Колыма                 | N 63°26'/E 140°38' | 1025                   | 11       | 7.14                 | 1.68     | 0.560                | 0.794                | 0.294    |
| 20                                                              | Магадан                | N 59°34'/E 151°7'  | 30                     | 16       | 6.57                 | 1.50     | 0.360                | 0.724                | 0.480    |
| 21                                                              | Камчатка               | N 56°01'/E 161°11' | 50                     | 16       | 5.00                 | 1.16     | 0.328                | 0.600                | 0.419    |

Таблица 1. Окончание

| №                                       | Популяция                    | Широта/долгота     | Высота над ур. моря, м | <i>N</i> | <i>Na</i>   | <i>I</i> | <i>Ho</i> | <i>He</i> | <i>F</i> |
|-----------------------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------|----------|-------------|----------|-----------|-----------|----------|
| 22                                      | Палево, о-в Сахалин          | N 50°34'/E 142°42' | 189                    | 16       | 6.57        | 1.52     | 0.341     | 0.751     | 0.523    |
| 23                                      | Невельск, о-в Сахалин        | N 46°40'/E 141°51' | 6                      | 8        | 5.86        | 1.48     | 0.551     | 0.751     | 0.195    |
| 24                                      | Сихотэ-Алинь                 | N 45°48'/E 136°36' | 1392                   | 16       | 6.7         | 1.37     | 0.387     | 0.676     | 0.471    |
|                                         | Среднее                      |                    |                        |          | 6.7         | 1.48     | 0.435     | 0.683     | 0.364    |
| <i>J. communis</i> var. <i>depressa</i> |                              |                    |                        |          |             |          |           |           |          |
| 25                                      | Аляска, Сев. Америка         | N 64°50'/E 147°40' | 135                    | 16       | <b>4.43</b> | 0.98     | 0.369     | 0.523     | 0.286    |
| <i>J. communis</i> var. <i>oblonga</i>  |                              |                    |                        |          |             |          |           |           |          |
| 26                                      | Сочи, гора Ачишко            | N 43°42'/E 40°10'  | 1000                   | 16       | 5.71        | 1.43     | 0.467     | 0.737     | 0.352    |
| 27                                      | Архыз, Карачаево-Черкесия    | N 43°34'/E 41°16'  | 2034                   | 12       | 4.71        | 1.23     | 0.363     | 0.628     | 0.437    |
| 28                                      | Теберда, Карачаево-Черкесия  | N 43°22'/E 41°43'  | 1700                   | 6        | 4.0         | 1.19     | 0.424     | 0.712     | 0.364    |
| 29                                      | Нальчик, Северная Осетия     | N 43°08'/E 43°29'  | 1470                   | 20       | 4.86        | 1.10     | 0.403     | 0.583     | 0.248    |
| 30                                      | Ногайская степь, Дагестан    | N 44°04'/E 45°35'  | 60                     | 16       | 4.29        | 1.00     | 0.325     | 0.547     | 0.483    |
| 31                                      | Талги, Дагестан              | N 42°62'/E 47°26'  | 458                    | 16       | 5.71        | 1.23     | 0.442     | 0.609     | 0.252    |
| 32                                      | Губден-Леваши, Дагестан      | N 42°32'/E 47°26'  | 870                    | 16       | 5.86        | 1.15     | 0.406     | 0.557     | 0.243    |
| 33                                      | Куппинский перевал, Дагестан | N 42°26'/E 47°01'  | 950                    | 16       | 5.86        | 1.22     | 0.508     | 0.601     | 0.119    |
| 34                                      | Цудахар, Дагестан            | N 42°19'/E 47°09'  | 1200                   | 15       | 5.86        | 1.36     | 0.431     | 0.686     | 0.366    |
| 35                                      | Гуниб, Дагестан              | N 42°24'/E 46°54'  | 1850                   | 16       | 6.00        | 1.33     | 0.301     | 0.631     | 0.423    |
|                                         | Среднее                      |                    |                        |          | 5.28        | 1.22     | 0.407     | 0.632     | 0.329    |

Примечание. *N* – общее число образцов; *Na* – среднее число аллелей на локус; *I* – индекс Шеннона, *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность, *He* – ожидаемая гетерозиготность; *F* – коэффициент инбридинга.

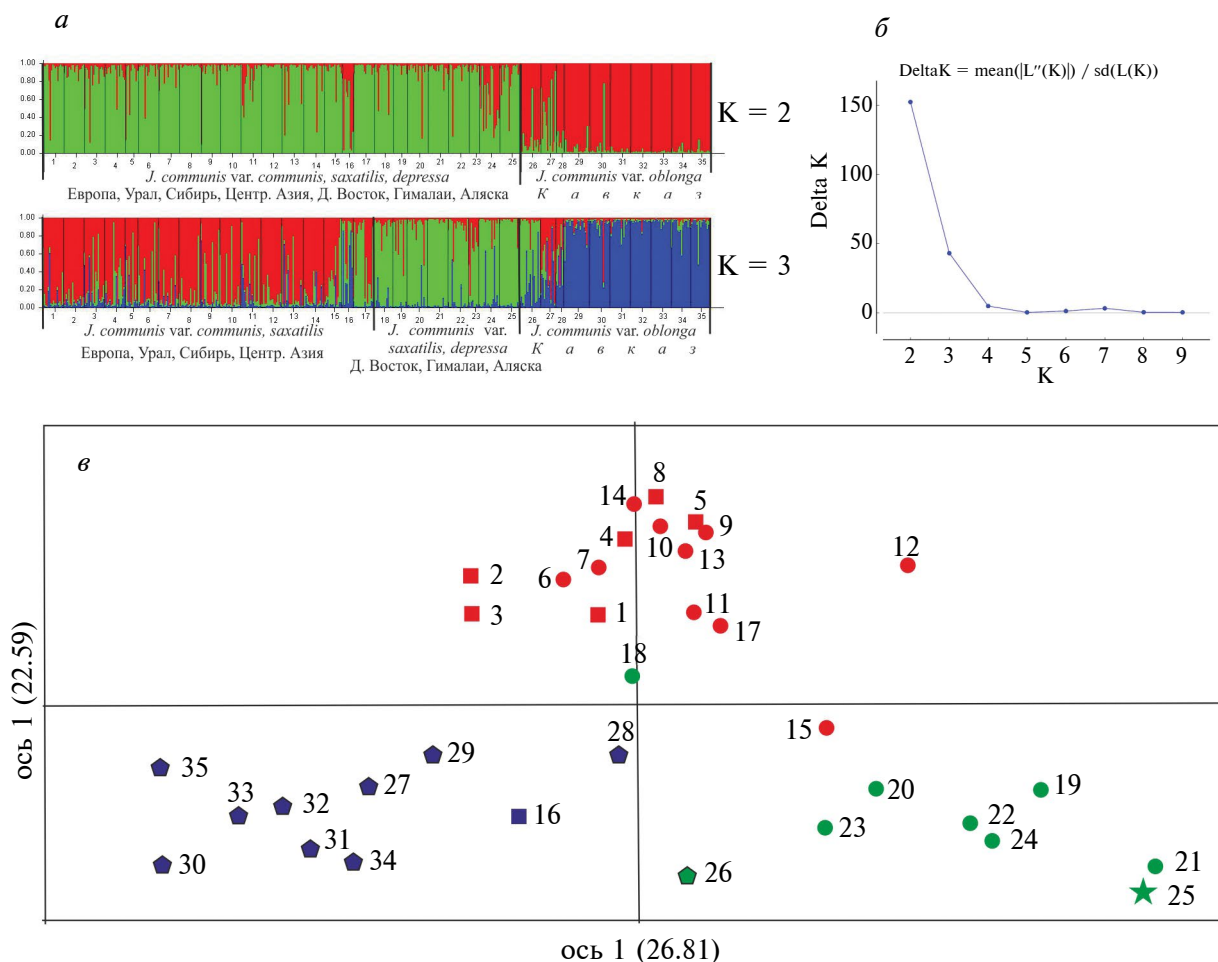
популяции со всего ареала из предыдущего исследования, 10 кавказских популяций и одна Балканская) мы использовали программу STRUCTURE 2.3.4. [29]. Наиболее вероятное число кластеров с наибольшим значением дельта  $K$  обнаружено при  $K = 2$  и  $3$  (рис. 1, а, б). Это означает, что оптимальное число генетических групп равно двум и трем. Наиболее дифференцирована кавказская разновидность *J. communis* var. *oblonga* ( $K = 2$ ). Затем ( $K = 3$ ) отделяются популяции можжевельника восточного края ареала в Евразии вместе с популяцией *J. communis* var. *depressa* из Аляски, что уже было нами показано ранее [25]. Следует отметить, что состав генотипов в популяциях можжевельника из Альп (№ 15), Болгарии (№ 16), Сочи (№ 26) и Архыза (№ 27) имеет смешанный характер.

Кластеризация популяций с помощью анализа главных координат на основе матрицы парных генетических дистанций  $D$  [30] показывает

похожую картину (рис. 1, в). Одна группа объединяет все кавказские популяции *J. communis* var. *oblonga*, в другую входят все дальневосточные популяции *J. communis* var. *saxatilis* вместе с популяцией *J. communis* var. *depressa* из Аляски (№ 25). Третья — это большая группа популяций *J. communis* var. *saxatilis* и *J. communis* var. *communis* из Северной Европы, Урала, Сибири и Центральной Азии. Удивительно, что болгарская популяция можжевельника (№ 16) находится в одной группе с кавказской разновидностью. А кавказская популяция из Сочи (№ 26), наоборот, выпадает из этой группы.

*Генетическая изменчивость и дифференциация популяций J. communis на Северном Кавказе, Альпах и Балканах по результатам анализа nSSR и хлДНК*

*Изменчивость nSSR.* В 10 популяциях кавказско-го можжевельника *J. communis* var. *oblonga* в семи

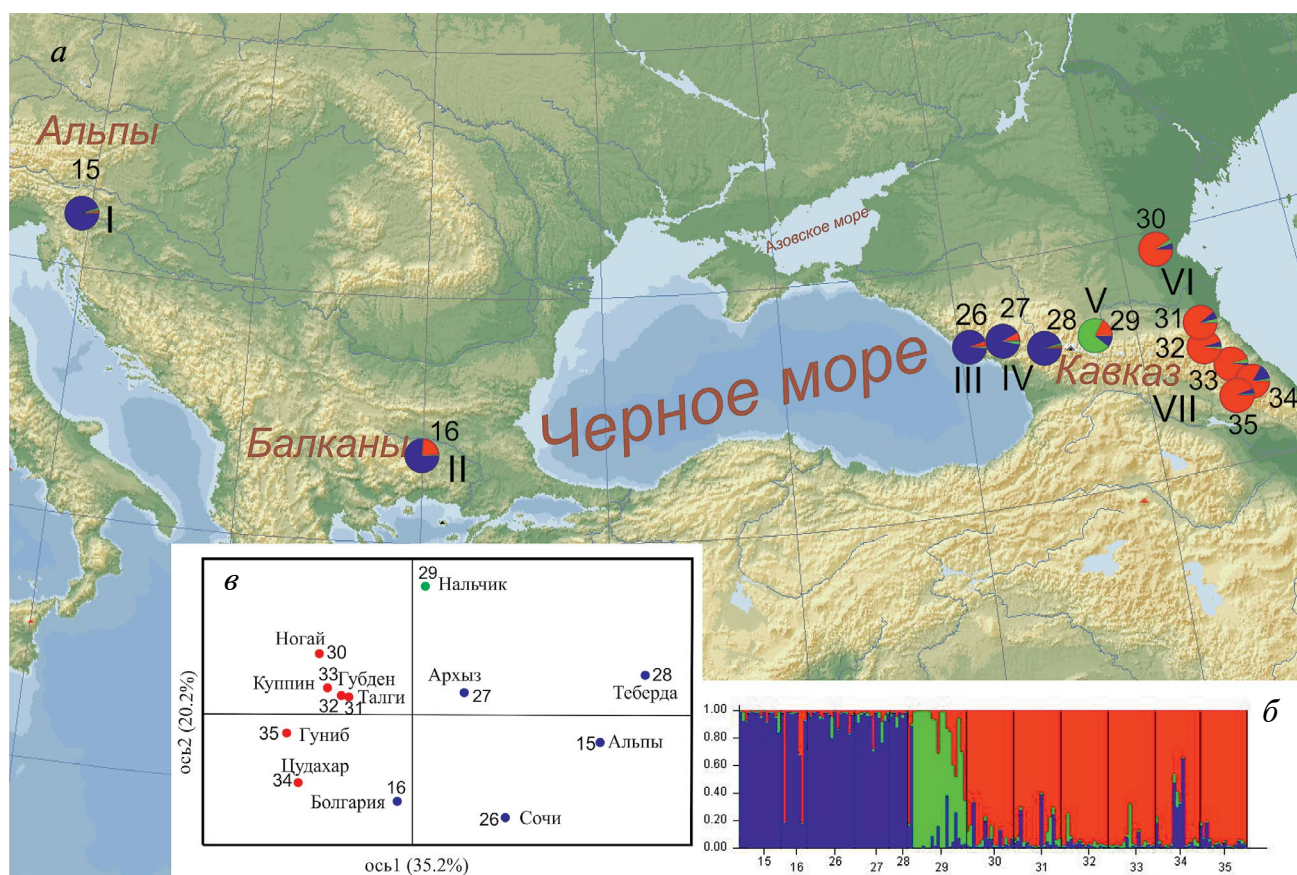


**Рис. 1.** Распределение генотипов и ординация популяций на основе полиморфизма nSSR в 35 популяциях *J. communis*. а — Диаграмма распределения генотипов в соответствии с кластеризацией в STRUCTURE ( $K = 2$  и  $K = 3$ ); б — оценка оптимального количества кластеров ( $K$ ) на основе дельта  $K$ ; в — анализ главных координат (РСоА) *J. communis* на основе парных значений  $D$ . Цвета соответствуют генетическим кластерам согласно STRUCTURE ( $K = 3$ ). Круг — *J. communis* var. *saxatilis*, квадрат — var. *communis*, звезда — var. *depressa*, многоугольник — var. *oblonga*. Номера популяций соответствуют табл. 1.

анализируемых локусах обнаружены 84 аллеля, из них 19 уникальных, которые в основном присутствуют в популяциях Сочи и Архыза. Генетическое разнообразие, оцененное с помощью  $H_e$ , в среднем для всех кавказских популяций составляет 0.632 и варьирует от 0.547 в Ногайской популяции до 0.737 в популяции Сочи. Все кавказские популяции, за исключением популяции из Сочи, имеют несколько сниженные показатели внутривидовой генетической изменчивости по сравнению с популяциями можжевельника из основного ареала (табл. 1). Но степень межпопуляционной дифференциации между ними при этом выше ( $F_{st} = 18.4\%$ ), чем между остальными популяциями ( $F_{st} = 9.8\%$ ).

В результате анализа филогеографической структуры кавказских популяций (с добавлением альпийской и болгарской популяций) с помощью STRUCTURE все шесть восточных дагестанских популяций группируются вместе (рис. 2, а,

б). Популяция из Нальчика формирует отдельный кластер. Три популяции из западной части Северного Кавказа (Сочи, Архыз, Теберда) образуют одну группу с популяциями из Болгарии и Альп. При учете географических дистанций (при использовании SAMOVA) число групп увеличивается до семи: I – Альпы, II – Болгария, III – Сочи, IV – Архыз с Тебердой, V – Нальчик, VI – полупустынная популяция из Ногайской степи, VII – все остальные горные дагестанские популяции. По результатам анализа главных координат все популяции по первой оси координат (35.2%) делятся на популяции восточной части Северного Кавказа (все дагестанские популяции) и популяции западной части кавказского ареала (рис. 2, в). При этом восточная часть генетически более однородна, чем западная, где между Сочи, Архызом, Тебердой и Нальчиком наблюдаются большие генетические дистанции. Согласно тесту Мантелла генетические расстояния между всеми изученными



**Рис. 2.** Карта района исследований с указанием мест отбора проб в 12 популяциях *J. communis*, распределение генотипов и ординация популяций на основе полиморфизма nSSR. а — карта расположения популяций *J. communis* с диаграммами распределения кластеров в STRUCTURE ( $K = 3$ ). Каждая популяция обозначена кружком, разделенным на сегменты пропорционально принадлежности количества ее особей к данному кластеру. Римскими цифрами обозначены группы, выделенные с помощью SAMOVA; б — диаграмма распределения генотипов в соответствии с кластеризацией в STRUCTURE ( $K = 3$ ); в — анализ главных координат (PCoA) на основе парных значений  $D_{ST}$ . Цвета кружков соответствуют генетическим группам согласно STRUCTURE ( $K = 3$ ).

популяциями *J. communis*, основанные на частотах nSSR-маркеров, достоверно коррелировали с географическими расстояниями между выборками ( $r = 0.507$ ,  $p = 0.02$ ).

**Изменчивость хпДНК.** Изменчивость хпДНК в кавказских популяциях находится на уровне средних значений, за исключением западных популяций (Сочи, Архыз, Теберда), где эти значения высоки и приближаются к максимальным, обнаруженным в альпийских популяциях (табл. 2). В десяти образцах можжевельника из Архыза, например, было выявлено семь разных гаплотипов, из них четыре редких. В популяции из Сочи шесть гаплотипов, из них три редких, причем один из них (H10) общий с альпийской популяцией из Северного Тироля. Все остальные кавказские гаплотипы 51, 52, 72–92 встречаются только на Кавказе.

Что касается болгарской популяции, то в отличие от результатов nSSR-анализа, по хлоропластным фрагментам она не имеет общих гаплотипов с кавказскими популяциями. Два гаплотипа 26 и 66, которые обнаружили здесь, встречаются также только в северных и восточных Альпах.

Уровень дифференциации по хлоропластным маркерам между кавказскими популяциями достаточно высок ( $F_{st} = 43\%$ ) и почти в 2 раза выше, чем между остальными европейскими популяциями можжевельника ( $F_{st} = 22\%$ ). Байесовский филогенетический анализ изменчивости хпДНК был проведен отдельно для кавказских популяций с добавлением популяции из Болгарии и альпийских популяций. Анализ с высокой бутстреп-поддержкой подтвердил дифференциацию популяций восточной части Северного Кавказа (рис. 3). Три хлоропластных гаплотипа 76, 77, 78 встречаются только здесь с большой частотой. В остальных кавказских популяциях они встречаются в качестве редких, в Нальчике не встречаются совсем. Также с высокой бутстреп-поддержкой выделяются некоторые альпийские гаплотипы (H62, 64–66). Все остальные гаплотипы формируют одну обширную группу, характерная черта которой – наличие большого повтора в хлоропластном фрагменте *16s-trnA*. В этом высокоизменчивом фрагменте у *J. communis* есть несколько больших tandemных повторов, один из которых длиной 146 пн характерен для всей большой группы гаплотипов, объединяющей популяции Европы, Урала и Сибири. Этого повтора нет в анцестральной гималайской популяции, популяциях Центральной Азии, популяциях северо-востока и Дальнего Востока России, Аляски. Нет его и в доминирующих гаплотипах (76, 77, 78) можжевельника восточной части Северного Кавказа. В альпийских популяциях присутствуют оба типа гаплотипов. В болгарской популяции гаплотип 26 с повтором, 66 – без него.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, дифференциация кавказского можжевельника от можжевельника основного ареала, ранее выявленная с помощью хлоропластных, аллозимных и морфологических маркеров, была подтверждена в данной работе с помощью ядерных микросателлитов. Кавказский хребет служил биогеографическим барьером для многих видов растений и животных, способствуя внутривидовой и внутривидовой дивергенции. Например, у той же сосны обыкновенной результаты анализа nSSR показали глубокую дифференциацию между популяциями всего Восточного Причерноморья и популяциями основного ареала, включая Балканы [31]. Наблюдаемый уровень генетической дивергенции между кавказскими популяциями лесной сони *Dryomys nitedula* (Pallas) и популяциями этого вида с Русской равнины позволяет предположить, что имела место длительная изоляция ареалов Европы и Кавказа *D. nitedula* на протяжении всего плейстоцена [32].

Между кавказскими популяциями сосны по трем типам маркеров (nSSR, мтДНК и cpSSR) выявлен более высокий уровень межпопуляционной дифференциации по сравнению с популяциями основного ареала, что свидетельствует о сниженном генетическом потоке и может объясняться особыми физико-географическими условиями данного региона [33]. Подобная дифференциация отмечена и для видов древесных растений, растущих в горных системах Средиземноморья. Например, разрозненные популяции *Frangulus alnus*, сохранившиеся на горных хребтах Средиземноморья, по-видимому, испытывали небольшой поток генов и поэтому накопили высокую степень дифференциации даже на небольшом удалении [34].

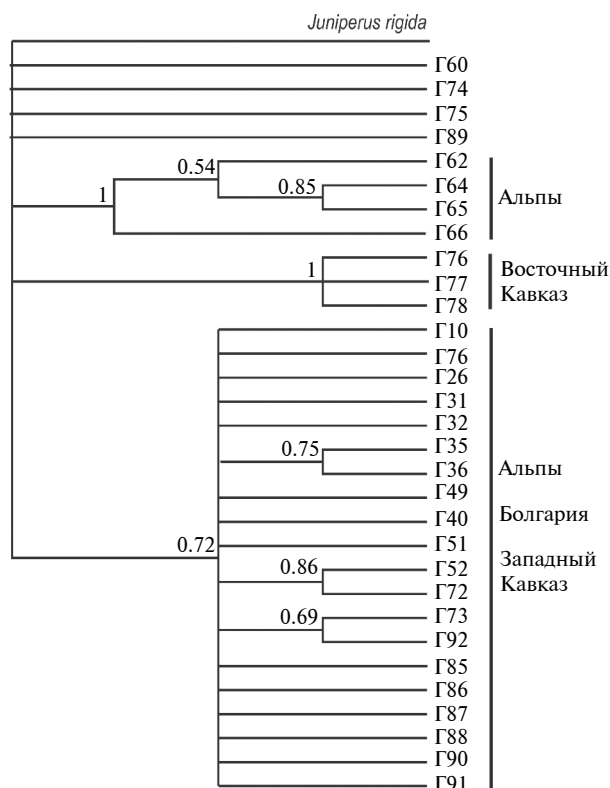
Эта же закономерность характерна и для *J. communis* var. *oblonga*. По результатам AMOVA дифференциация популяций по nSSR-маркерам на основном ареале составляет 9.8%, в то время как на Кавказе она почти в 2 раза больше (18.4%). Дифференциация по хлоропластным маркерам также в 2 раза больше – 22 и 43% соответственно.

По результатам анализа nSSR все популяции *J. communis* var. *oblonga* в настоящей работе разделились на три группы, соответствующие трем географическим регионам Большого Кавказа: западному, центральному и восточному. Похожая дифференциация свойственна и некоторым другим древесным видам. Например, присутствие двух главных генетических линий – восточной и западной – обнаружено на Кавказе у разных видов дубов [35], сосны обыкновенной [31, 36]. Предполагают, что у сосны эта фрагментация ареала произошла в период, предшествующий последнему ледниковому максимуму, 149 тыс. л. н., что примерно соответствует микулинскому межледниковью.

**Таблица 2.** Показатели генетического разнообразия в популяциях *J. communis* по результатам изменчивости хпДНК-маркеров

| №                                                          | Популяция                         | Широта /<br>долгота | Высота<br>над ур.<br>моря | $N$ | $N_H$ | $N_{PH}$ | Гаплотипы (частота, %)                                                                                                                | $h$  | $\pi$ |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|-----|-------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|
| <i>J. communis</i> var. <i>communis</i> / <i>saxatilis</i> |                                   |                     |                           |     |       |          |                                                                                                                                       |      |       |
| 15                                                         | Северный<br>Тироль,<br>Альпы      | N 47°11' / E 12°0'  | 1700                      | 26  | 13    | 7        | H10(4), 16(4), <b>26(19)</b> ,<br>31(4), 32(8), <b>35(11)</b> ,<br>36(8), 9(4), <b>60(15)</b> , 62(4),<br>64(4), 65(4), <b>66(12)</b> | 0.93 | 0.070 |
| 16                                                         | Болгария,<br>Балканы              | N 42°02' / E 24°42' | 607                       | 9   | 2     | 0        | <b>H26(89)</b> , 66(11)                                                                                                               | 0.22 | 0.027 |
| <i>J. communis</i> var. <i>oblonga</i>                     |                                   |                     |                           |     |       |          |                                                                                                                                       |      |       |
| 26                                                         | Сочи,<br>гора Ачишко              | N 43°42' / E 40°10' | 1000                      | 15  | 6     | 3        | H10(7), 78(7), <b>85(27)</b> ,<br><b>86(40)</b> , 87(13), 88(7)                                                                       | 0.79 | 0.057 |
| 27                                                         | Архыз,<br>Карачаво-<br>Черкесия   | N 43°34' / E 41°16' | 2034                      | 10  | 7     | 4        | H76(10), 77(10),<br><b>88(30)</b> , 89(20),<br>90(10), 91(10), 92(10)                                                                 | 0.91 | 0.076 |
| 28                                                         | Теберда,<br>Карачаво-<br>Черкесия | N 43°22' / E 41°43' | 1700                      | 11  | 5     | 0        | <b>H51(55)</b> , 72(9), 7<br>3(18), 75(9), 78(9)                                                                                      | 0.71 | 0.058 |
| 29                                                         | Нальчик,<br>Северная<br>Осетия    | N 43°08' / E 43°29' | 1470                      | 17  | 5     | 2        | H40(12), <b>51(64)</b> ,<br>52(12), 72(6), 75(6)                                                                                      | 0.58 | 0.028 |
| 30                                                         | Ногайская<br>степь,<br>Дагестан   | N 44°04' / E 45°35' | 60                        | 23  | 3     | 0        | <b>H72(57)</b> , <b>77(30)</b> , 78(13)                                                                                               | 0.60 | 0.070 |
| 31                                                         | Талги,<br>Дагестан                | N 42°62' / E 47°26' | 458                       | 21  | 4     | 0        | H72(5), 76(5),<br><b>77(81)</b> , 78(9)                                                                                               | 0.35 | 0.020 |
| 32                                                         | Губден,<br>Дагестан               | N 42°32' / E 47°26' | 870                       | 20  | 3     | 0        | H74(5), <b>77(80)</b> , 78(15)                                                                                                        | 0.35 | 0.018 |
| 33                                                         | Куппин,<br>Дагестан               | N 42°26' / E 47°01' | 950                       | 19  | 4     | 0        | H51(16), 72(16),<br>76(5), <b>77(63)</b>                                                                                              | 0.59 | 0.061 |
| 34                                                         | Цудахар,<br>Дагестан              | N 42°19' / E 47°09' | 1200                      | 22  | 3     | 0        | H74(4), <b>77(92)</b> , 78(4)                                                                                                         | 0.18 | 0.009 |
| 35                                                         | Гуниб,<br>Дагестан                | N 42°24' / E 46°54' | 1850                      | 22  | 6     | 0        | H51(4), 72(4), 73(4),<br>76(9), <b>77(69)</b> , 78(9)                                                                                 | 0.42 | 0.038 |

Примечание.  $N$  – число образцов,  $N_H$  – число гаплотипов,  $N_{PH}$  – число уникальных гаплотипов,  $h$  – гаплотипическое разнообразие,  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие. Жирным шрифтом выделены гаплотипы, наиболее распространенные в популяции.



**Рис. 3.** Байесовское дерево, основанное на гаплотипах хпДНК *J. communis* с *J. rigida* в качестве внешней группы.

У можжевельника одну большую однородную группу образуют все популяции восточной части Большого Кавказа (Дагестан). Возможно, восточная часть является изолированным древним рефугиумом, который не имел вторичных контактов с европейскими популяциями. Есть молекулярные данные, свидетельствующие об изолированном длительном произрастании в рефугиумах восточной части Кавказа другого древесного вида — ольхи черной [37].

В отдельную группу выделилась популяция из Центрального Кавказа (Нальчик). Возможно, эта популяция была изолирована от остальных кавказских популяций высокими хребтами или в этой части можжевельник расселился из отдельного ледникового рефугиума и испытал генетический дрейф.

Что касается западной части кавказского ареала можжевельника, то и хлоропластные, и ядерные маркеры указывают на возможные контакты с можжевельником из основного ареала.

Близость хлоропластных гаплотипов можжевельника из западной и центральной частей Большого Кавказа к гаплотипам основного ареала может свидетельствовать о существовании предковых филогенетических связей этой более гумидной

части Кавказа с другими европейскими горными системами, например с Балканами и Альпами. Интересно, что в популяции из окрестностей Сочи, которая является крайней западной точкой на Кавказе в нашей работе, обнаружен редкий хлоропластный гаплотип № 10, встречающийся также только в популяции из Северных Альп. По некоторым морфологическим параметрам популяция из Сочи занимает промежуточное положение между кавказской и евросибирской группами. А по такому показателю, как число устьичных полосок, эта популяция вообще не вошла в кавказскую группу [13].

Большой tandemный повтор в хлоропластном фрагменте *16s-trnA* у *J. communis* сформировался, возможно, в Альпах и распространился на север, вплоть до Арктики, и по горным системам на Балканы и на Западный Кавказ. На Кавказе в условиях изоляции гаплотипы с таким повтором эволюционировали и накопили отличия от гаплотипов основного ареала. В восточной части Кавказа сохранились предковые гаплотипы, без этой мутации.

В структуре изменчивости ядерной ДНК связь западных кавказских популяций с популяциями основного ареала выражена еще отчетливее, что свидетельствует о лучшем генном потоке ядерной ДНК по сравнению с хлоропластной. ХпДНК у можжевельника распространяется по отцовской линии, т. е. с пыльцой, а ядерная ДНК — по материнской линии с семенами. Теоретически пыльца летит гораздо дальше, чем семена, большая часть которых опадает и прорастает вблизи дерева. Однако на самом деле та часть семян, которую съедают птицы, к тому же птицы перелетные, движущиеся каждую осень по одному и тому же маршруту, может распространиться очень далеко.

Характерная черта, отделяющая род *Juniperus* от других родов семейства кипарисовых, — образование в процессе эволюции ягодоподобной шишки с сочной мякотью, что явилось прогрессивным признаком и обеспечило семенам распространение птицами на дальние расстояния. В межледниковые периоды в плейстоцене рассеивание семян птицами обеспечивало виду не только очень быструю постгляциальную экспансию, но и постоянный обмен генами между популяциями на обширном ареале в Евразии.

Известно, что современные маршруты миграций птиц с севера на юг проходят каждой осенью по определенным путям. В это время созревают шишкоягоды можжевельника. В некоторых местах этих миграций возникают скопления птиц из-за «эффекта бутылочного горлышка». Одним из таких узких мест являются окрестности Красной Поляны (Сочи). Кавказский хребет для птиц — серьезное препятствие из-за высоких горных вершин. Птицы преодолевают его через перевалы, придерживаясь

долин горных рек. Аибга — это хребет, который окружает Красную Поляну с юго-восточной стороны и разделяет среднюю часть долины Мзымты и верховья Псоу. Именно эти участки являются традиционными маршрутами для миграции птиц. Другой известный маршрут миграций птиц проходит через черноморское побережье Болгарии, так называемая Виа Понтика [38].

Учитывая направление этих миграций, наверное, не случайно, что nSSR генотипы можжевельника из районов Сочи, Архыза и Теберды находятся в одном STRUCTURE-кластере с болгарской и альпийской популяциями. Из всех кавказских популяций эти три популяции имеют самые высокие показатели внутривидового разнообразия по хлоропластным маркерам, близкие к показателям можжевельника из основного ареала. По ядерным маркерам самые высокие показатели разнообразия из всех кавказских популяций имеет популяция из района Сочи. Это может свидетельствовать о существовании генного потока с севера с семенами к популяциям западной части Кавказа и о наличии гибридизации. Сосна обыкновенная, например, не обладает столь эффективным способом рассеивания семян, как можжевельник, и все ее кавказские популяции имеют пониженную генетическую изменчивость по сравнению с популяциями основного ареала [36].

Миграции птиц, проходящие вдоль западной части черноморского побережья, могли способствовать гибридизации можжевельника из основного ареала и Западного Кавказа. Восточная часть Кавказа осталась генетически более изолированной по сравнению с западной. Пример такого проникновения с севера Русской равнины на Западный Кавказ, приведшего к гибридизации и образованию рекомбинантного гаплотипа мтДНК, доказан у сосны обыкновенной [33]. И в соответствии с оценкой, полученной с помощью ABC-моделирования, эти контакты, скорее всего, имели место в начале голоцена (19.4 тыс. л. н.). При этом, в отличие от можжевельника, ядерные и хлоропластные маркеры не обнаружили у сосны такой связи.

Таким образом, можно предположить, что когда-то популяции можжевельника на Кавказе и в других европейских горных системах (Балканах, Альпах) были связаны непрерывным ареалом вида, который затем был разорван в результате климатических изменений в плейстоцене, вследствие чего можжевельник оказался изолированным в рефугиумах Кавказа. Поток пыльцы мог прекращаться, что отразилось в структуре изменчивости хлоропластной ДНК. Установившиеся в межледниковые периоды маршруты миграций перелетных птиц способствовали расселению семян можжевельника на большие расстояния и контактам этого вида с основной частью евразийского ареала с западной частью Кавказа, что отразилось на структуре

изменчивости ядерной ДНК. Можжевельник, растущий в более изолированной восточной части Северного Кавказа, хотя и имеет меньшие показатели разнообразия по сравнению с западной частью, тем не менее его длительное стабильное существование способствовало накоплению уникального запаса генетической изменчивости.

Если говорить о можжевельнике обыкновенном в целом, то в итоге можно прийти к выводу, что не ледниковые циклы, а географическая изоляция является основным фактором, влияющим на генетическую структуру популяций этого вида, обладающего набором уникальных качеств, таких как морфологическая пластичность, холодостойкость и эффективный способ рассеивания семян.

Выражаю благодарность Б. Хейнцу за сбор образцов можжевельника в Альпах, Ц. Радуковой за сбор образцов на Балканах, В.Л. Семерикову за сбор образцов в Краснодарском крае и Карачаево-Черкесии, Л.А. Горлановой за сбор образцов в Северной Осетии и А.М. Мусаеву за помощь в сборе образцов в Дагестане.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН № 122021000090-5.

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.

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petit R.J., Aguinagalde I., de Beaulieu J.L. et al. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity // *Science*. 2003. V. 300. P. 1563–1565. doi:10.1126/science.1083264
2. Tribsch A., Stuessy T. Evolution and phylogeography of arctic and alpine plants in Europe: Introduction // *Taxon*. 2003. V. 52. P. 415–416. doi:10.2307/3647443
3. Tarasov P.E., Volkova V.S., Webb T. et al. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia // *J. Biogeogr.* 2000. V. 27. P. 609–620. doi:10.1046/j.1365-2699.2000.00429.x
4. Maliouchenko O., Palme A.E., Buonamici A. et al. Comparative phylogeography of two European birch species, *Betula pendula* and *B. pubescens*, with high level of haplotype sharing // *J. Biogeogr.* 2007. V. 34. P. 1601–1610. doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01729.x

5. *Palme A.E., Su Q., Rautenberg A. et al.* Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula* // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 201–212.
6. *Semerikov V.L., Semerikova S.A., Polezhaeva M.A. et al.* Southern montane populations did not contribute to the recolonization of West Siberian Plain by Siberian larch (*Larix sibirica*): A range-wide analysis of cytoplasmic markers // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. P. 4958–4971.
7. *Polezhaeva M.A., Lascoux M., Semerikov V.L.* Cytoplasmic DNA variation and biogeography of *Larix* Mill. in Northeast Asia // *Mol. Ecol.* 2010. V. 19. P. 1239–1252.
8. *Prost S., Guralnick R.P., Waltari E. et al.* Losing ground: Past history and future fate of Arctic small mammals in a changing climate // *Glob. Change Biol.* 2013. V. 19. P. 1854–1864.
9. *Bruhaux J., Zhao W., Hall D. et al.* Scots pine – panmixia and the elusive signal of genetic adaptation // *New Phytol.* 2024. В печати.  
<https://doi.org/10.1111/nph.19563>
10. *Mao K., Hao G., Liu J. et al.* Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): Variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals // *New Phytol.* 2010. V. 188. P. 254–272.
11. *Hantemirova E.V., Heinze B., Knyazeva S.G. et al.* A new Eurasian phylogeographical paradigm? Limited contribution of southern populations of the recolonization of high latitude populations in *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) // *J. Biogeogr.* 2017. V. 44. I. 2. P. 271–282.  
[doi: 10.1111/jbi.12867](https://doi.org/10.1111/jbi.12867).
12. *Willis K.J., Van Andel T.H.* Trees or not trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation // *Quaternary Sci. Rev.* 2004. V. 23. P. 2269–2287.
13. *Князева С.Г., Хантемирова Е.В.* Сравнительный анализ генетической и морфолого-анатомической изменчивости можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) // *Генетика.* 2020. Т. 56. № 1. С. 55–66.
14. *Галушко А.И.* Флора Северного Кавказа. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1978. 318 с.
15. *Джанаева В.М.* Определитель семейства можжевельниковых. Фрунзе: Илим, 1969. 93 с.
16. *Черепанов С.К.* Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб: Мир и семья, 1995. 990 с.
17. *Имханицкая Н.Н.* Критическая заметка о кавказских видах секции *Juniperus* рода *Juniperus* L. (Cupressaceae) // *Новости систематики высших растений.* Л.: Наука, 1990. Т. 27. С. 5–16.
18. *Farjon A.* World Checklist and Bibliography of Conifers. England: The Royal Bot. Gardens, 2001. 309 p.
19. *Adams R.P.* Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting // *Biochem. Syst. Ecol.* 2000. V. 28. P. 515–528.
20. *Adams R.P., Demeke T.* Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) // *Taxon.* 1993. V. 42. P. 553–572.
21. *Adams R.P., Hsieh C., Murata J., Pandey R.N.* Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) // *Biochem. Syst. Ecol.* 2002. V. 30. P. 231–241.
22. *Adams R.P., Pandey R.N.* Analysis of *Juniperus communis* and its varieties based on DNA fingerprinting // *Biochem. Syst. Ecol.* 2003. V. 31. P. 1271–1278.
23. *Adams R.P., Murata J., Takahashi H., Schwarzbach A.E.* Taxonomy and evolution of *Juniperus communis*: Insight from DNA sequencing and SNPs // *Phytologia.* 2011. V. 93. I. 2. P. 185–196.
24. *Хантемирова Е.В., Беркутенко А.Н., Семериков В.Л.* Систематика и геногеография *Juniperus communis* L. по данным изоферментного анализа // *Генетика.* 2012. Т. 48. № 9. С. 1077–1084.
25. *Хантемирова Е.В., Бессонова В.А.* Генетическое разнообразие можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) в Евразии и на Аляске по данным анализа ядерных микросателлитов // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 3. С. 316–326.
26. *Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 673–679.
27. *Michalczyk I.M., Sebastiani I.F., Buonamici A. et al.* Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. P. 346–348.  
[doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01227.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01227.x)
28. *Rumeu B., Sosa P.A., Nogales M., Gonzalez-Perez M.A.* Development and characterization of 13 SSR markers for an endangered insular juniper (*Juniperus cedrus* Webb & Berth.) // *Conserv. Genet. Resources.* 2013. V. 5. P. 457–459.  
[doi: 10.1007/s12686-012-9827-y](https://doi.org/10.1007/s12686-012-9827-y)
29. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959. [doi:10.1093/genetics/155.2.945](https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945)
30. *Nei M.* Genetic distance between populations // *Am. Nat.* 1972. V. 106. P. 283–292.  
<http://dx.doi.org/10.1086/282771>
31. *Семериков Н.В., Петрова И.В.* Демографическая история сосны обыкновенной в плейстоцене в Северной Евразии и Кавказском регионе на основе анализа ядерных микросателлитных локусов // *Сиб. экол. журн.* 2023. Т. 5. С. 573–590.
32. *Grigoryeva O., Krivonogov D., Balakirev A. et al.* Phylogeography of the forest dormouse *Dryomys nitedula* (Gliridae, Rodentia) in Russian Plain and the Caucasus // *Folia Zool.* 2015. V. 64. № 4. P. 361–364.

33. *Semerikov N.V., Petrova I.V., Sannikov S.N. et al.* Cytoplasmic DNA variation does not support a recent contribution of *Pinus sylvestris* L. from the Caucasus to the main range // *Tree Genet. Genomes*. 2020. V. 16. P. 59.  
<https://doi.org/10.1007/s11295-020-01458-8>
34. *Hampe A., Arroyo J., Jordano P., Petit R.J.* Rangewide phylogeography of a bird-dispersed Eurasian shrub: Contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 3415–3426.
35. *Ekhvaia J., Simeone M.K., Silakadze N., Abdaladze O.* Morphological diversity and phylogeography of the Georgian durmast oak (*Q. petraea* subsp. *iberica*) and related Caucasian oak species in Georgia (South caucasus) // *Tree Genet. Genomes*. 2018. V. 14. P. 17.
36. *Petrova I.V., Sannikov S.N., Tembotova F.I. et al.* Genogeography of *Pinus sylvestris* L. populations in the Greater Caucasus and Crimea // *Russ. J. Ecol.* 2017. V. 48. P. 524–531.  
<https://doi.org/10.1134/s106741361706008x>
37. *Roy M., Pozzi A.C., Gareil R. et al.* Alder and the Golden Fleece: High diversity of Frankia and ectomycorrhizal fungi revealed from *Alnus glutinosa* subsp. *barbata* roots close to a Tertiary and glacial refugium // *PeerJ*. 2017. V. 18.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.3479>
38. *Michev T.M., Profirov L.A., Karaivanov N.P., Michev B.T.* Migration of soaring birds over Bulgaria // *Acta Zool. Bulg.* 2012. V. 64. I. 1. P. 33–41.

## Genetic Evaluation of *Juniperus Communis* var. *oblonga* (Cupressaceae) in Caucasus Regions of Russia Based on nSSR Markers

E. V. Hantemirova\*

*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia*

\*e-mail: [hantemirova@ipae.uran.ru](mailto:hantemirova@ipae.uran.ru)

Ten populations of Caucasian juniper *J. communis* var. *oblonga* were analyzed using seven microsatellite nSSR loci to draw conclusions about migration routes and genetic relationships with populations in the northern part of their range. These new data were combined with data previously obtained from the main Eurasian range. The results of nSSR analysis confirm the data on the cpDNA structure of *J. communis* var. *oblonga* about the existence of a deep divergence between the populations of the eastern part of the Greater Caucasus and the populations of the main range, which is likely due to the long-term isolation of juniper in this part of the Caucasus. At the same time, the results indicate the existence of a juniper gene flow from the main range towards the Western Caucasus, which was more intense with seeds. The migration routes of birds established during interglacial periods contributed to the dispersal of seeds over long distances and contacts of juniper from the main part of its range with juniper in the western part of the Caucasus, which was reflected in the structure of nuclear DNA.

**Keywords:** *J. communis* var. *oblonga*, nuclear DNA, nSSR, genetic diversity, Greater Caucasus.

УДК595.789: 591.15 (470.1)

## ГАПЛОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БЕЛЯНОЧКИ *Leptidea morsei* (Fenton, 1882) (Lepidoptera, Pieridae) НА СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ПЕРИФЕРИИ АРЕАЛА

© 2024 г. О. И. Кулакова<sup>1, \*</sup>, Д. М. Шадрин<sup>1</sup>, А. Г. Татарин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, 167982 Россия

\*e-mail: kulakova@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 11.03.2024 г.

После доработки 11.04.2024 г.

Принята к публикации 18.04.2024 г.

Получены первые сведения о гаплотипическом разнообразии в природных популяциях беляночки *L. morsei* на северо-востоке Русской равнины и в северных областях Урала, где проходит северо-западная граница распространения вида. Было выявлено шесть гаплотипов, из них пять обнаружены только в изучаемом регионе. Сравнительный анализ гаплотипического разнообразия в разных частях видовой ареала и географическое распределение гаплотипов позволили сделать предварительный вывод о том, что популяционные группировки *L. morsei* на северо-западе ареала имеют большее генетическое сходство с азиатскими популяциями, чем с изолированными центральноевропейскими. Расселение данного вида на север Русской равнины и Урала в послеледниковую эпоху, очевидно, происходило по югу Западно-Сибирской равнины через Южное Зауралье.

**Ключевые слова:** *Leptidea morsei*, северо-запад, ареал, гаплотипы, COI.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090071 **EDN:** ADRSOS

Беляночка *Leptidea morsei* (Fenton, 1882) — центральноевро-трансзиатский температный вид, основная часть ареала которого располагается в лесной зоне и лесостепи Сибири, Монголии, Китая и Дальнего Востока до Сахалина, о. Хоккайдо и Корейского п-ова включительно [1–3]. Достоверно установлено, что *L. morsei* встречается на всем протяжении от Южного до Полярного Урала [4, 5] и в таежной зоне северо-востока Русской равнины (Республика Коми, Кировская область, Пермский край) [6–8]. Локальные видовые популяции обнаружены на северо-западе Архангельской области [9], в Среднем и Нижнем Поволжье (Ульяновская, Саратовская, Пензенская области, Чувашия, Удмуртия, Марий-Эл) [10–12], Белгородской, Нижегородской и Ярославской областях России [13–15], Черниговской и Житомирской областях Украины [16], возможно, и в Тульской области [17]. Центральноевропейская географически изолированная часть ареала *L. morsei* включает Карпаты и Прикарпатье, восток Альпийской области и север Балкан [18, 19].

Фрагментированное распространение беляночки *L. morsei* и определенные фенотипические отличия изолированных популяций в рамках обширного ареала обусловили описание исследователями нескольких подвидовых форм, валидность которых

остается дискуссионной. Центральноевропейские популяционные группировки относят к подвиду *L. morsei major* Grund, 1905, описанному с территории Хорватии [12, 19]. Восточноевропейские популяции также относили к этому подвиду [1, 2, 12, 19] или отождествляли с подвидом *L. morsei morseides* Verity, 1911, описанным с Восточных Саян [20]. Во втором издании Каталога чешуекрылых России [3] для российской фауны указывается только один номинативный подвид *L. morsei morsei*, типовым местонахождением которого является о. Хоккайдо в Японии.

Несомненно, что фрагментированное распространение и образование популяционных изолятов беляночки *L. morsei*, особенно в западной части ареала, имеет историческую основу. Глобальные климатические колебания в позднем плейстоцене и голоцене вызывали неоднократные смещения природных зон в Евразии, что определяло пути расселения вида и в конечном итоге отражалось на генетической структуре вида.

Для реконструкции процесса становления современных ареалов видов и решения вопросов подвидовой систематики чешуекрылых все шире привлекаются молекулярно-филогенетические методы, в том числе посредством изучения их гаплотипического разнообразия на основании

нуклеотидной последовательности митохондриального гена, кодирующего первую субъединицу фермента цитохромоксидазы (*COI*). В современных представлениях экологов и генетиков жизнеспособность популяций в процессе расселения видов или в условиях географической изоляции во многом определяется их генетическим разнообразием. Снижение генетического разнообразия популяций, как правило, сопровождается снижением их адаптационных возможностей к стрессовым воздействиям окружающей среды, которые наиболее остро проявляются на периферии ареала [21, 22]. В то же время известно, что у некоторых видов чешуекрылых популяции генетически не дифференцированы и могут относиться к одной гаплогруппе (генетической линии), у других имеют свои уникальные гаплотипы на краю ареала [23]. В связи с этим исследования по выявлению и изучению гаплотипов видов чешуекрылых на границах распространения приобретают особую актуальность.

Материалов по гаплотипическому разнообразию *L. morsei* практически нет. Единственное упоминание об этом можно найти в Атласе митохондриального генетического разнообразия чешуекрылых Западной Палеарктики [24], но в связи с малым количеством образцов (8 шт.) авторы не смогли провести полноценный анализ генетического разнообразия. Также крайне мало работ, посвященных молекулярно-филогенетическому анализу вида *L. morsei* [25, 26].

Настоящая статья посвящена описанию гаплотипического разнообразия беляночки *L. morsei* на северо-западной границе распространения, выявлению возможных путей расселения вида на северо-восток Европы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом послужили полевые сборы имаго *Leptidea morsei*, сделанные авторами в период с 2007 г. по 2016 г. на северо-востоке Русской равнины и Приполярном Урале. Для молекулярно-филогенетического анализа были использованы образцы 22 экз. имаго из шести выборок. Все полученные последовательности исследуемых образцов депонированы в базу данных GenBank с присвоенными номерами (табл. 1). Дополнительно был проанализирован доступный материал по *L. morsei* (22 образца) из генетических баз.

Биологический материал — брюшко бабочки — фиксировали в очищенном 96%-ном этаноле. Выделение геномной ДНК из 22 образцов проводилось с помощью ионообменной смолы Chelex-100 (Sigma-Aldrich, США). Образец помещали в 15 мкл 10%-ного раствора Chelex-100 и инкубировали в твердотельном термостате при температуре 55 °С в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Далее в течение 10 мин инкубировали при

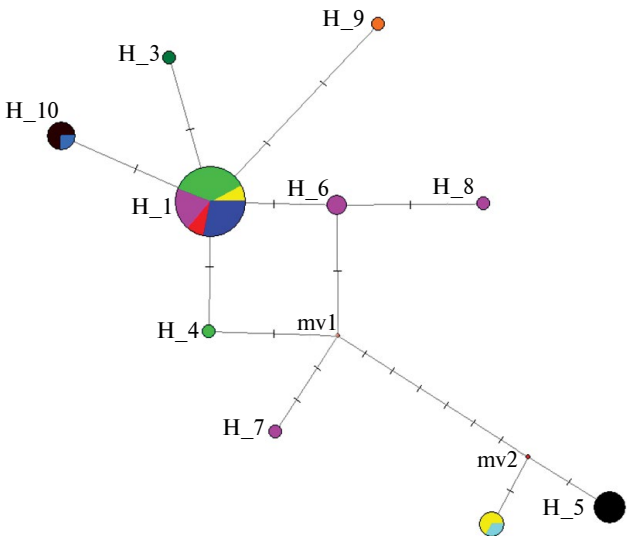
температуре 99 °С. Выделенная ДНК хранилась при температуре –20 °С.

В качестве молекулярного маркера для анализа гаплотипического разнообразия был выбран стандартный ДНК-баркод (фрагмент гена *COI* длиной 658 пн). Для амплификации фрагмента *COI* использовались праймеры HCO2198 (5'-TAA ACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') и LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATGG-3') [27]. Амплификацию фрагмента проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей 10 мкл ScreenMix (Евроген, Россия), 10 мкл каждого праймера (0.3 мкМ) (Евроген, Россия), 18.0 мкл ddH<sub>2</sub>O ("Ambion", США) и 2.0 мкл геномной ДНК (1–100 нг). Амплификацию проводили в термоциклере Т-100 ("Биорад", США) по следующей схеме: предварительная денатурация – 95 °С (5 мин); следующие пять циклов: денатурация – 90 °С (30 сек), отжиг – 45 °С (60 сек), элонгация – 72 °С (90 сек); затем 27 циклов: денатурация – 90 °С (30 сек), отжиг – 55 °С (45 сек), элонгация – 72 °С (60 сек) и финальная элонгация – 72 °С (2 мин).

Продукты реакции амплификации разгонялись электрофорезом в 1.3%-ном агарозном геле с 1х трисацетатным буферным раствором с бромистым этидием и визуализировались при помощи трансиллюминатора UVT-1 (Биоком, Москва). Для очистки полученного ПЦР продукта использовался набор CleanUp Standart (Евроген). Концентрацию ДНК и ПЦР-продуктов измеряли на флуориметре Qubit 3 (Invitrogen, США). Секвенирование проводилось на базе Центра коллективного пользования "Молекулярная биология" ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН на приборе НАНОФОР 05 (Синтол, Россия) с использованием набора реагентов BigDye Terminator v. 3.1 (Invitrogen). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с применением алгоритма ClustalW в программе Mega X [28, 29]. Идентификация полученных последовательностей проводилась с использованием ресурсов GenBank, BLAST [30] и BOLD Systems [31]. Гаплотипическое (*h*) и нуклеотидное (*π*) разнообразие, число вариабельных (полиморфных) сайтов (*S*), стандартное отклонение разнообразия гаплотипов (*SD*) оценивались с помощью программы DNAsp 6 [32]. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов была построена в программе Network 10200 с использованием алгоритма Median-Joining [33]. Каждый гаплотип в медианной сети представлен кругом, и его размер пропорционален количеству образцов, показывающих его уникальную последовательность, таким образом распространенные гаплотипы кажутся крупнее, а редкие — мельче (рис. 1). Количество мутаций между гаплотипами обозначено цифрами над соединениями, а гаплотипы изображены с использованием цветов, полученных после анализа основных координат.

**Таблица 1.** Материал, использованный при изучении гаплотипического разнообразия беляночки *Leptidea morsei* (Fent.)

| Место и год сбора оригинального материала, данные Genbank                                         | Номер образца в Genbank (число образцов)                       | Автор коллекции (идентификатор в коллекции)                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, ур. Кобра, 60.05° с. ш., 50.78° в. д., 2016 г.         | MG491397 (1)                                                   | Кулакова О.И. (Komi Kobra)                                                                |
| Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, с. Дон, 61.64° с. ш., 53.89° в. д., 2008 г.            | ON175841–ON175843 (3)                                          | Кулакова О.И. (Komi Don)                                                                  |
| Россия, Республика Коми, Прилузский р-н, д. Прокопьевка, 59.28° с. ш., 49.67° в. д., 2007 г.      | ON175844 (1)                                                   | Кулакова О.И. (Komi Prokopievka)                                                          |
| Россия, Республика Коми, Приполярный Урал, оз. Пономаревское, 64.89° с. ш., 59.26° в. д., 2011 г. | MG491399, MG491400 (2)                                         | Кулакова О.И. (Prepolar_Ural)                                                             |
| Россия, Республика Коми, Усть-Куломский р-н, ур. Красный Яр, 61.57° с. ш., 55.01° в. д., 2012 г.  | MG491440, MG491443, MG491444, MG491448, MG491453, MG491454 (6) | Кулакова О.И. (Komi Krasny_Yar)                                                           |
| Россия, Республика Коми, г. о. Ухта, р. Чуть, 63.75° с. ш., 53.37° в. д., 2013 г.                 | MG491460, MG491474–MG491477, MG491481–MG491483, MG491485 (9)   | Кулакова О.И. (Komi Chud)                                                                 |
| Russia:West Siberia, Novosibirsk                                                                  | HG969241–HG9692501 (11)                                        | Solovyev et al. (L60-70)                                                                  |
| Romania: Transylvania, Cluj, Badeni                                                               | HQ004590–HQ004593, MW501236 (5)                                | Dinca et al. (RV-08-A026, RV-07-C176, RV coll.-08-M498, RV coll.-08-M499, RV coll.140558) |
| Казахстан                                                                                         | FJ663714, FJ663715 (2)                                         | Lukhtanov et al. (2005-LOWA-181, 2005-LOWA-182)                                           |
| Казахстан                                                                                         | JF512618, JF512619 (2)                                         | Dinca et al. (RV coll.-07-Z083, RV coll.-07-Z124)                                         |
| Словения                                                                                          | MN140234 (1)                                                   | Dapporto et al. (RV coll.14-U867)                                                         |
| Южная Корея                                                                                       | GU372563 (1)                                                   | Kim et al. (No)                                                                           |



**Рис. 1.** Медианная сеть митохондриальных гаплотипов (митотипов), идентифицированных в изученных выборках беляночки *L. morsei* (Fent.) на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена *COI*. Цветовые обозначения гаплотипов: фуксия – Чуть: Н1 (*n* = 5), Н6 (2), Н7 (1), Н8 (1); черный – Румыния: Н5 (5); бирюзовый – Словения: Н2 (1); голубой – Прокопьевка: Н10 (1); желтый – Казахстан: Н1 (2), Н2 (2); коричневый – Дон: Н10 (3); оранжевый – Кобра: Н9 (1); салатовый – Новосибирск: Н1 (10), Н4 (1); красный – Приполярный Урал: Н1 (2); синий – Красный Яр: Н1(6); зеленый – Ю. Корея: Н3 (1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На общую длину (*l*) сравниваемых последовательностей 639 пн пришлось 16 вариабельных сайтов, из которых семь характерны только для выборки бабочек-беляночек *L. morsei* с северо-запада ареала распространения исследуемого вида. Гаплотипическое разнообразие (*h*) всех 44 образцов, включенных в анализ, составило 0.654;

разнообразие 22 образцов, собранных на северо-западе видового ареала, составило 0.617 (табл. 2).

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *COI* мтДНК всех полученных нами и имеющихся в базах данных образцов позволил выявить 10 гаплотипов (Н1–Н10) (рис. 1, табл. 3). Показано, что из 10 гаплотипов шесть (Н1, Н6–Н10) включают образцы бабочек-беляночек *L. morsei* с северо-запада видового ареала, из них пять (Н6–Н10) обнаружены только в изучаемом регионе (табл. 2). Проанализировав нуклеотидные последовательности каждого из гаплотипов, было выявлено, что в гаплотипах Н1, Н4 и Н6 нет уникальных сайтов в сравнении с другими гаплотипами или, другими словами, в образцах, вошедших в данные гаплотипические группы, в процессе эволюции не возникло изменений в последовательности гена *COI*, характерных только для данных образцов (табл. 3).

Самым распространенным является гаплотип Н1, который включил в себя 25 из 44 образцов *L. morsei*, из которых 13 собраны в изучаемом регионе: ур. Красный Яр (6), р. Чуть (5), Приполярный Урал (2), что составляет 55% от всего количества образцов в данном гаплотипе. Остальные образцы, попавшие в данную группу (12 шт.), взяты из базы данных GenBank (NCBI, 2023) и принадлежат к двум регионам: Новосибирск (10) и Казахстан (2) (табл. 1). Гаплотип Н3 имел только один образец из Южной Кореи, Н4 – один образец из Новосибирска, Н5 – пять образцов из Румынии, наконец гаплотип Н6 имел два образца беляночек *L. morsei* с р. Чути.

Анализ нуклеотидных последовательностей гаплотипов Н2, Н3, Н5, Н8 и Н10 показал наличие в них по одной замене в положениях 97 (А/Г), 439 (С/Т), 622 (Г/А), 497 (С/Т) и 31 (Т/А) соответственно для каждого гаплотипа относительно остальной выборки образцов, включенных в анализ. Образцы, вошедшие в гаплотипы Н2, Н3, Н5,

**Таблица 2.** Генетическое разнообразие в исследуемых выборках беляночки *Leptidea morsei* (Fent.)

| Образцы                                     | <i>l</i> | <i>n</i> | <i>h</i> | <i>SD</i> | <i>S</i> | $\pi$   |
|---------------------------------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|---------|
| С западной границы региона ( <i>N</i> = 22) | 639      | 6        | 0.617    | 0.072     | 7        | 0.00178 |
| Весь набор образцов ( <i>N</i> = 44)        | 639      | 10       | 0.654    | 0.053     | 16       | 0.00521 |

Примечание. *N* – число индивидуальных образцов; *l* – длина сравниваемых последовательностей, пн; *n* – число гаплотипов; *SD* – стандартное отклонение разнообразия гаплотипов; *S* – число полиморфных сайтов;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие.

**Таблица 3.** Вариабельные сайты гена цитохромоксидазы (*COI*) мтДНК беляночки *Leptidea morsei* (Fent.) в популяционных группировках на северо-западе видового ареала

| Гаплотип<br>(число<br>образцов) | Вариабельные сайты |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------|--------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                 | 31                 | 73 | 97 | 163 | 202 | 203 | 232 | 265 | 315 | 439 | 497 | 583 | 613 | 622 | 628 | 629 |
| H_1 (25)                        | A                  | A  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | T   | T   | C   | T   | T   | A   | A   | G   |
| H_2 (3)                         | A                  | G  | A  | G   | T   | T   | T   | T   | C   | T   | C   | C   | C   | A   | A   | G   |
| H_3 (1)                         | A                  | A  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | T   | C   | C   | T   | T   | A   | A   | G   |
| H_4 (1)                         | A                  | A  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | Y   | T   | C   | T   | T   | A   | A   | G   |
| H_5 (5)                         | A                  | G  | G  | G   | T   | T   | T   | T   | C   | T   | C   | C   | C   | G   | A   | G   |
| H_6 (2)                         | A                  | G  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | T   | T   | C   | T   | T   | A   | A   | G   |
| H_7 (1)                         | A                  | G  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | C   | T   | C   | T   | T   | A   | G   | A   |
| H_8 (1)                         | A                  | G  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | T   | T   | T   | T   | T   | A   | A   | G   |
| H_9 (1)                         | A                  | A  | G  | A   | C   | C   | C   | C   | T   | T   | C   | T   | T   | A   | A   | T   |
| H_10 (4)                        | T                  | A  | G  | A   | C   | C   | C   | T   | T   | T   | C   | T   | T   | A   | A   | G   |

Примечание. Полужирным шрифтом обозначены уникальные сайты, встречающиеся в гаплотипах. Верхняя строка – пн.

H8 и H10, собраны в Словении, Южной Кореи, Румынии, на р. Чути и в с. Дон соответственно (табл. 3).

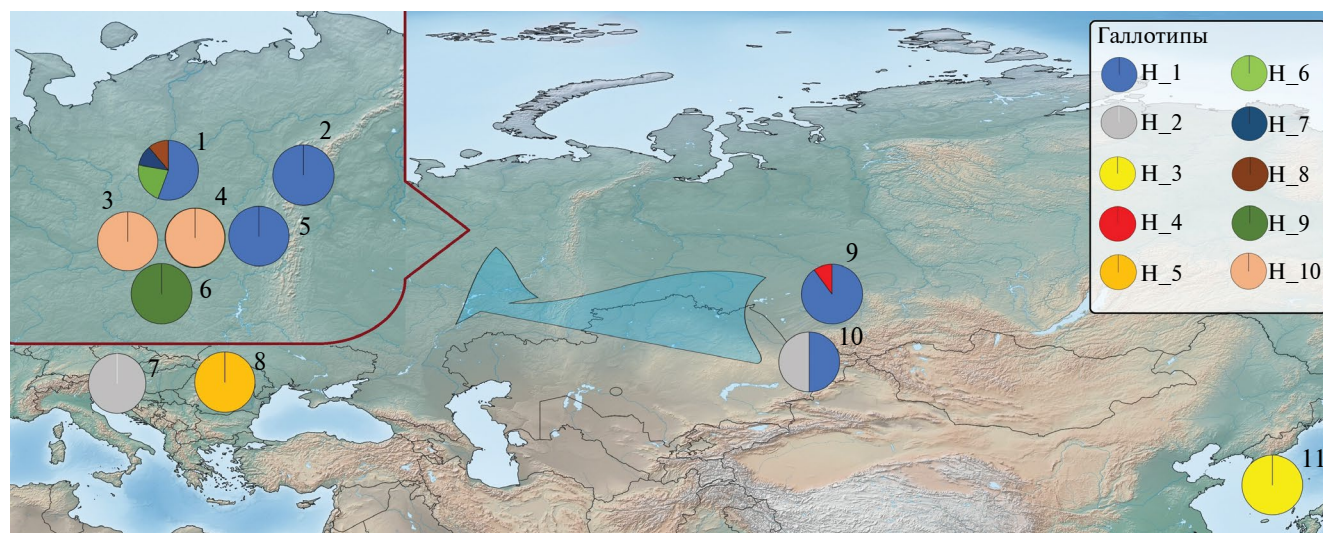
В нуклеотидных последовательностях гаплотипов H7 и H9 имеются по две замены в положениях 628 (A/G), 629 (G/A или T) и 265 (C/T), 629 (T/A или G) соответственно для каждого гаплотипа относительно остальной выборки (табл. 3). Каждый из гаплотипов представлен одним образцом: гаплотип H7 – Чуть, H9 – Кобра (табл. 1). Наличие двух замен, отмеченных для каждого из этих двух гаплотипов (образцов), отсутствующих во всей оставшейся выборке, свидетельствует о наличии специфической мутации или вариации в геноме бабочки. Такие уникальные замены могут быть связаны с генетическими отличиями, которые могут влиять на фенотип или на определенные биологические процессы (сроки лёта, питание, размножение и откладка яиц).

Группирование гаплотипов в медианной сети в целом подтверждает и уточняет характер взаимоотношений, характер и миграционные пути распространения исследуемой бабочки. Центральноевропейские образцы с гаплотипами H5 (Румыния, пять образцов), H2 (Словения, один образец) и два образца с гаплотипом H2 из Казахстана выделились в отдельный кластер. Остальные гаплотипы, среди которых все найденные на северо-западе видового ареала *L. morsei*, сгруппировались вокруг наиболее распространенного гаплотипа H1 и могут считаться его производными (рис. 1).

Объем доступного для анализа материала по гаплотипическому разнообразию беляночки *L. morsei*

не позволяет пока точно установить характер микроэволюционных событий, которые привели к формированию наблюдаемого распределения гаплотипов на географической карте (рис. 2). Однако совершенно очевидно, что популяционные группировки беляночки *L. morsei* на северо-западе ареала имеют большее генетическое сходство с азиатскими популяциями, чем с изолированными центральноевропейскими.

Надо отметить, что по биопреферендуму *L. morsei* – опушечно-лесной гелиофил, топически связанный с лиственными и смешанными лесами, травянистыми перелесками и разнотравными лесными опушками. В связи с этим, опираясь на палеогеографические материалы и полученные данные по гаплотипическому разнообразию *L. morsei*, логично предположить, что расселение данного вида на север Русской равнины и Урала происходило в послеледниковую эпоху с юго-восточного направления, а именно по югу Западносибирской равнины, через Южное Зауралье одновременно с распространением по региону смешанных и широколиственных лесов в какой-либо из климатических оптимумов голоцена. Создается впечатление, что после очередной смены зон растительности в результате похолодания климата на рубеже голоцена и антропоцена к настоящему времени здесь сохранились лишь остаточные популяционные изоляты некогда крупной географической популяции вида. С этого времени их гаплотипическое разнообразие формировалось независимо, а микроэволюционная история отлична от азиатских и тем более центральноевропейских группировок вида.



**Рис. 2.** Карта-схема распределения гаплотипов в выборках *L. morsei* (Fent.) и вероятные пути расселения вида в постледниковую эпоху. Места сбора образцов: 1 – Чуть, 2 – Приполярный Урал, 3 – Прокопьевка, 4 – Дон, 5 – Красный Яр, 6 – Кобра, 7 – Словения, 8 – Румыния, 9 – Новосибирск, 10 – Казахстан, 11 – Южная Корея. Стрелкой обозначено вероятное направление миграции вида на европейский северо-восток России.

Таким образом, полученные результаты позволили дать предварительную оценку гаплотипическому разнообразию бабочек *L. morsei* на северо-западной периферии ареала. Было выявлено шесть гаплотипов, из них пять обнаружены только в изучаемом регионе. Для большего понимания филогенетической истории и филогеографии исследуемого вида необходимо больше данных об их последовательностях с других территорий. Это в дальнейшем позволит перейти от оценки разнообразия на основе мтДНК и филогеографии бабочек рассматриваемого региона к более обширным сравнительным исследованиям популяций данного вида и более глубокому пониманию видообразования путем секвенирования всего генома, а также с привлечением изучения морфологических и экологических признаков в популяциях из других регионов.

Работа выполнена в Институте биологии Коми НЦ УрО РАН в рамках Государственного задания по теме “Разнообразие фауны и пространственно-экологическая структура животного населения европейского северо-востока России и сопредельных территорий в условиях изменения окружающей среды и хозяйственного освоения”, № гос. регистрации 122040600025-2.

Исследование одобрено Этическим комитетом Института биологии Коми НЦ УрО РАН (протокол №2/2024 от 10.04.2024). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршунов Ю.П. Булавоусые чешуекрылые Северной Азии. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2002. 424 с. (Korshunov Yu.P. Butterflies of Northern Asia. Moscow: KMK Scientific Press, 2002. 424 p.)
2. Gorbunov P., Kosterin O. The Butterflies (Hesperioidea and Papilionoidea) of North Asia (Asian part of Russia) in Nature. М.: Rodina and Fodio; Cheliabinsk: Gallery Fund, 2003. V1. 392 p.
3. Дубатов В.В., Львовский А.Л., Стрельцов А.Н. Pieridae // Каталог чешуекрылых (Lepidoptera) России. Изд. 2. СПб.: Зоол. ин-т РАН, 2019. С. 201–204. (Dubatolov V.V., Lvovsky A.L., Streltsov A.N. Pieridae // Catalogue of the Lepidoptera of Russia. Edition 2. St. Petersburg: Zoological Institute RAS, 2019. P201–204.)
4. Татаринов А.Г., Горбунов П.Ю. Структура и пространственная организация фауны булавоусых чешуекрылых (Lepidoptera, Rhopalocera) Урала // Зоол. журн. 2014. Т. 93. Вып. 1. С. 108–128. (Tatarinov A.G., Gorbunov P.Yu. Structure and spatial organization of the Butterfly fauna (Lepidoptera, Rhopalocera) of the Ural Mountains // Rus. J. Zoology. 2014. V. 93. № 1. P. 108–128.)
5. Моргунов Д.В. Новые данные о распространении булавоусых чешуекрылых арктической тундры в бассейне р. Кара (Полярный Урал) // Russ. Entomol. J. 2017. V. 26 (4). P. 343–347. (Morgun D.V. New data on the distribution of Butterflies of the Arctic tundra in the Kara River basin (Polar Ural) // Russian Entomological Journal. 2017. V. 26 (4). P. 343–347.)
6. Большаков Л.В., Татаринов А.Г., Кулакова О.И. Самые северные местонахождения видов рода *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) в

- Республике Коми // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2007. Вып. 11–12. С. 88–89. (*Bolshakov L.V., Tatarinov A.G., Kulakova O.I.* The most northern localities of species of the genus *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) in the Komi Republic // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2007. № 11–12. P. 88–89.)
7. *Татаринов А.Г.* География дневных чешуекрылых европейского Северо-Востока России. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2016. 255 с. (*Tatarinov A.G.* Geography of Butterflies of the European North-East of Russia. Moscow: KMK Scientific Press, 2016. 255 p.)
  8. *Адаховский Д.А.* Дополнения к фауне дневных чешуекрылых (Lepidoptera: Hesperioidea, Papilionoidea) Удмуртии и Кировской области с замечаниями по фауне Вятско-Камского междуречья в целом // Вестн. Удмуртского ун-та. Серия Биология. Науки о Земле. 2019. Т. 29. Вып. 4. С. 544–548. (*Adakhovsky D.A.* Additions to the Butterfly fauna (Lepidoptera: Hesperioidea, Papilionoidea) Udmurtia and the Kirov Regions with comments on the history of the Vyatka-Kama interfluvium as a whole // Bulletin of the Udmurt University. Biology series. Earth Sciences. 2019. V. 29. № 4. P. 544–548.)
  9. *Большаков Л.В., Татаринов А.Г., Кулакова О.И., Болотов И.Н.* Самые северные местонахождения видов рода *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) в Архангельской области // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2008. Вып. 15–16. С. 90–91. (*Bolshakov L.V., Tatarinov A.G., Kulakova O.I., Bolotov I.N.* The northernmost localities of species of the genus *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) in the Arkhangelsk Province // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2008. № 15–16. P. 90–91.)
  10. *Большаков Л.В., Лосманов В.П.* К фауне белянок рода *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) Чувашии и некоторых сопредельных территорий // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2005. Вып. 1. С. 36–38. (*Bolshakov L.V., Losmanov V.P.* On the fauna of white butterflies of the genus *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) of Chuvashia and some adjacent territories // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2005. № 1. P. 36–38.)
  11. *Большаков Л.В., Полумордвинов О.А.* Нахождение *Leptidea morsei* (Fenton, 1882) (Lepidoptera: Pieridae) в Пензенской области // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2006. Вып. 5. С. 36–37. (*Bolshakov L.V., Polumordvinov O.A.* The finding of *Leptidea morsei* (Fenton, 1882) (Lepidoptera: Pieridae) in the Penza Area // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2006. № 5. P. 36–37.)
  12. *Львовский А.Л., Моргун Д.В.* Булавоусые чешуекрылые Восточной Европы. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2007. 443 с. 8 цв. вкладок. (*Lvovsky A.L., Morgun D.V.* Butterflies of the Eastern Europe. Moscow: KMK Scientific Press, 2007. 443 p., 8 col. pl.)
  13. *Большаков Л.В., Клепиков М.А., Целебровский М.В.* О нахождении белянки *Leptidea reali* Reissinger 1989 (Lepidoptera: Pieridae) в Ярославской области // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2005. Вып. 1. С. 53–64. (*Bolshakov L.V., Klepikov M.A., Celebrovski M.V.* On the finding of white butterfly *Leptidea reali* Reissinger, 1989 (Lepidoptera: Pieridae) in the Yaroslavl Area // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2005. № 1. P. 53–64.)
  14. *Корб С.К., Пожогин Д.А., Затакова А.А.* Фауна чешуекрылых (Lepidoptera) Нижегородской области // Тр. Мордовского гос. природного заповедника им. П.Г. Смидовича. 2020. Вып. 25. С. 123–287. (*Korb S.K., Pozhogin, D.A. Zakatova A.A.* Lepidoptera fauna Nizhny Novgorod region // Proceedings of the Mordovian State Nature Reserve. № 25. P. 123–287.)
  15. *Годин А.Е.* К фауне чешуекрылых (Lepidoptera) в Белгородской области // Полевой журн. биолога. 2021. Т. 3. № 1. С. 18–24. (*Godin A.E.* To the Lepidoptera fauna in the Belgorod region // Field Biologist Journal. 2021. V. 3. № 1. P. 18–24.)
  16. *Кавурка В.В., Шешурак П.Н.* О распространении в Украине бабочек рода *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) // Міжнародні Новорічні біологічні читання. Николаев, 2006. С. 113–117. (*Kavurka V.V., Sheshurak P.N.* On the distribution of white butterfly *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) in Ukraine // International New Year's biologic readings. Nikolaev, 2006. P. 113–117.)
  17. *Большаков Л.В., Ньюкеркен ван Э.Й., Пискунов В.И., Ловцова Ю.А.* Дополнения и уточнения к фауне чешуекрылых (Lepidoptera) Тульской области. 1 // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. 2008. Вып. 13–14. С. 53–64. (*Bolshakov L.V., Nyukerken van E.Y., Piskunov V.I., Lovtsova Yu.A.* Additions and clarifications to the Lepidoptera fauna Tula region. 1 // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2008. № 13–14. P. 53–64.)
  18. *Kudrna O., Harpke A., Lux K. et al.* Distribution Atlas of Butterflies in Europe // Gesellschaft für Schmetterlingsschutz. V.Halle, 2011. 576 p.
  19. *Tshikolovets V.V.* Butterflies of Europe and the Mediterranean area. Pardubice: Tshikolovets Publ., 2011. 544 p.
  20. *Корб С.К., Большаков Л.Г.* Каталог булавоусых чешуекрылых (Lepidoptera: Papilioniformes) бывшего СССР. 2-е издание, переработанное и дополненное // Эверсманния. Энтомологические исследования в России и соседних регионах. Отдельный выпуск 2. Тула: Гриф и К°, 2011. 124 с. (*Korb S.K.,*

- Bolshakov L.V.* A catalogue of Butterflies (Lepidoptera: Papilionoformes) of the former USSR. Second Edition, reformatted and updated // Eversmannia. Entomological research in the Russia and adjacent region. 2016. Supplement № 2. P. 53–64.)
21. *Шварц С.С.* Экспериментальные методы исследования начальных стадий микроэволюционного процесса // Внутривидовая изменчивость наземных позвоночных животных и микроэволюция. Свердловск, 1966. С. 21–32. (*Schwartz S.S.* Experimental methods for the study of the initial stages of the microevolutionary process // Intraspecific variability of terrestrial vertebrates and microevolution. Sverdlovsk, 1966. P. 21–32.)
22. *Avise J.C.* Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 2000. 464 p.
23. *Todisco V., Vodă R., Prosser S.W., Nazari V.* Next generation sequencing-aided comprehensive geographic coverage sheds light on the status of rare and extinct populations of *Aporia* butterflies (Lepidoptera: Pieridae) [Electronic resource] // Scientific Reports. 2020. V. 10. Режим доступа: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70957-4>
24. *Dapporto L., Menchetti M., Vodă R. et al.* The atlas of mitochondrial genetic diversity for Western Palearctic butterflies // Global Ecol. Biogeogr. 2022. P. 1–7. DOI: 10.1111/geb.13579
25. *Gascoigne-Pees M., Trew D., Pateman J., Verovnik R.* The distribution, life cycle, ecology and present status of *Leptidea morsei* (Fenton 1882) in Slovenia with additional observations from Romania (Lepidoptera: Pieridae) // Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo. 2008. V. 29 (3). P. 113–121.
26. *Kulakova O.I., Tatarinov A.G., Shadrin D.M.* Species composition of wood whites of the genus *Leptidea* Billberg (Lepidoptera, Pieridae) in Northeastern Europe based on DNA barcoding // Entomol. Review. 2022. V. 102. № 7. P. 2–9.
27. *Folmer O., Black M., Hoeh W. et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Marine Biology and Biotechnology. 1994. V. 3. P. 294–299.
28. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22 (22). P. 4673–4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673
29. *Kumar S., Stecher G., Li M. et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biology and Evolution. 2018. V. 35(1). P. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
30. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Publ. on the Internet. 2024. [URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Accessed 25 February 2024).
31. BOLD Systems. Published on the Internet. 2024. [URL: <http://www.boldsystems.org/>] (Accessed 15 February 2024).
32. *Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism analysis of large data sets // Mol. Biology and Evolution. 2017. V. 34. Iss. 12. P. 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
33. *Bandelt H.J., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biology and Evolution. 1999. V. 16. Iss. 1. P. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

## Haplotypic Diversity of *Leptidea morsei* (Fenton, 1882) (Lepidoptera, Pieridae) on the Northwestern Periphery of the Area

O. I. Kulakova<sup>1</sup>, \*, D. M. Shadrin<sup>1</sup>, A. G. Tatarinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia*

*\*e-mail: kulakova@ib.komisc.ru*

The first data on haplotypic diversity in natural populations of the *L. morsei* in the north-east of the Russian plain and in the northern regions of the Urals have been obtained. Our interest is caused by the fact that the northwestern border of this species distribution passes here. Six haplotypes were identified, of which five were found only in the studied region. A comparative analysis of haplotypic diversity in different parts of the species range and the geographical distribution of haplotypes allowed us to draw a preliminary conclusion that the population groupings of *L. morsei* in the north-west of the range have greater genetic similarity with Asian populations than with isolated Central European ones. The settlement of this species to the north of the Russian Plain and the Urals in the post-Glacial epoch obviously took place along the south of the West Siberian Plain through the Southern Trans-Urals.

**Keywords:** *Leptidea morsei*, north-west, area, haplotypes, *COI*.

УДК 575:599.9

## ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

© 2024 г. О. В. Кочетова<sup>1, \*</sup>, Д. Ш. Авзалетдинова<sup>2</sup>, Т. М. Кочетова<sup>2</sup>,  
Т. В. Викторова<sup>2</sup>, Г. Ф. Корытина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,  
институт биохимии и генетики, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия  
\*e-mail: Olga\_MK78@mail.ru

Поступила в редакцию 23.01.2024 г.

После доработки 26.02.2024 г.

Принята к публикации 10.04.2024 г.

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) — это заболевание, характеризующееся повышенным содержанием глюкозы в крови, формирующееся в результате нарушения механизмов связывания инсулина с клетками. Использовали образцы ДНК больных ( $N = 535$ ) и здоровых ( $N = 475$ ) индивидов. Нами выявлена ассоциация с риском развития СД2-локусов генов днРНК в аддитивной модели *LINC02227 rs2149954* ( $OR = 0.76$ ,  $P = 0.0083$ ,  $P_{FDR} = 0.017$ ), *LINC00305 rs2850711* ( $OR = 1.43$ ,  $P = 0.0017$ ,  $P_{FDR} = 0.004$ ) и *CDKN2B-AS1 rs4977574* ( $OR = 0.70$ ,  $P = 0.0001$ ,  $P_{FDR} = 0.0003$ ). Для локуса *rs2850711* гена *LINC00305* выявлена ассоциация с уровнем глюкозы натощак ( $P = 0.023$ ), уровнем С-пептида ( $P = 0.00001$ ), для локусов *LINC02227 rs2149954* и *CDKN2B-AS1 rs4977574* установлена ассоциация с гипертензией. Локус *MALAT1 rs619586*, аллель *A* ассоциирован с повышенным уровнем С-пептида ( $P = 0.017$ ), с ЛПНП ( $P = 0.012$ ) и общим холестерином ( $P = 0.01$ ). Для локуса *CDKN2B-AS1 rs4977574* показана ассоциация с уровнем С-пептида ( $P = 0.027$ ). Локус *LINC02227 rs2149954* ( $P = 0.0011$ ,  $P_{FDR} = 0.008$ ) ассоциирован с развитием ожирения. Локус *rs7158663* гена *MEG3* ассоциирован с постинфарктным кардиосклерозом ( $P = 0.02$ ). Проведенный анализ ROC-кривых показал, что исследуемые локусы *MEG3 rs7158663*, *H19 rs3741219*, *MALAT1 rs619586*, *LINC02227 rs2149954*, *LINC00305 rs2850711*, *CDKN2B-AS1 rs4977574* и такие переменные, как пол, возраст обследуемых и уровень ИМТ, включенные в построение модели расчета риска, могут предсказывать развитие СД2 с чувствительностью 98.0% и специфичностью 97.0%, площадь под кривой AUC составила 95.30% (95%CI 93.50–97.40).

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2-го типа, длинные некодирующие РНК, однонуклеотидный полиморфизм.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090083 **EDN:** ADLXNV

Сахарный диабет 2 типа (СД2) является сложным заболеванием, в развитии которого принимают участие как генетические, так и средовые факторы. Выявление предполагаемых генетических вариантов, обуславливающих вариативность генов днРНК, а также определение их функциональной значимости остается слабо изученной проблемой. По результатам широкогеномных ассоциативных исследований (GWAS) были выявлены однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) не только в генах, кодирующих белки, большинство из установленных вариантов определено в некодирующих областях, связанных с дисфункцией поджелудочной железы и развитием диабета [1, 2].

днРНК — это один из наиболее распространенных классов длинных некодирующих РНК, транскрибирующихся у человека. днРНК принято определять как транскрипты длиной более 200

нуклеотидов, выполняющие функции РНК без последующей трансляции в белки [3]. Активное исследование днРНК позволило установить потенциальную роль этих транскриптов в развитии и прогрессировании диабета, ожирения, инсулинорезистентности, а также осложнений, вызываемых диабетом [4]. Известно, что днРНК регулируют метаболизм глюкозы, а также синтез и секрецию инсулина [5].

Полиморфные варианты генов днРНК, расположенные в сайтах связывания с мишенями микроРНК, могут влиять на взаимодействие микроРНК — днРНК и регулировать экспрессию генов, кодирующих белки [6]. Известно, что такие днРНК как *H19*, *MEG3* и *MALAT1* регулируют гомеостаз глюкозы и функцию  $\beta$ -клеток [7, 8]. Ингибитор циклин-зависимой киназы 2В — антисмысловая РНК 1 (*CDKN2B-AS1*), ассоциирован

с развитием диабета типа 2 [9, 10], ишемической болезнью сердца [11], атеросклерозом [12] и онкологическими заболеваниями [13]. По результатам GWAS установлено, что аллель *T* локуса rs2149954 гена *LINC02227* ассоциирован с долголетием [14], также для этого ОНП показана ассоциация с такими показателями, как триглицериды и холестерин [15]. Анализ результатов GWAS выявил ОНП rs2850711 гена *LINC00305*, ассоциированный с развитием воспаления и атеросклерозом [16]. Ассоциации полиморфных вариантов генов днРНК с развитием сахарного диабета типа 2 или сосудистыми осложнениями не вызывают сомнений, однако механизм, посредством которого осуществляется влияние, остается невыясненным. Интеграция знаний о взаимодействии днРНК с другими некодирующими и белок-кодирующими генами будет иметь решающее значение для понимания биологической организации, необходимой для оценки развития многофакторного заболевания. Проведение данного исследования было мотивировано высокой распространенностью СД2 и ожирения в России, так распространенность СД2 в России составляет 5.4%, тогда как распространенность состояния преддиабета достигает 19.3% и ожирения 24.3% [17, 18]. Учитывая данный факт, выявление

потенциальных диагностических маркеров и, в частности, новых потенциальных терапевтических мишеней для лечения диабета и ранней диагностики представляется актуальным.

Цель исследования — анализ полиморфных вариантов генов днРНК: *MEG3 rs7158663*, *H19 rs3741219*, *MALAT rs619586*, *LINC02227 rs2149954*, *LINC00305 rs2850711*, *CDKN2B-AS1 rs4977574* у пациентов с СД2, с осложнениями, вызываемыми диабетом и показателями, характеризующими СД2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы образцы ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Группа больных СД2 составила 535 человек. Диагноз СД2 ставился на совокупности кодов МКБ-10 [19]. Группа пациентов была сформирована с учетом клинко-инструментального исследования на базе многопрофильного стационара Городская клиническая больница № 21 г. Уфы. Контрольная группа включала 475 практически здоровых индивидов. Характеристика групп пациентов и контроля представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика выборок, включенных в исследование

| Параметры                                                  | Контроль<br><i>N</i> = 475 | СД2<br><i>N</i> = 535 | <i>P</i> |
|------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------|
| Возраст, лет, среднее ± Std. dv.                           | 49.64 ± 10.87              | 53.58 ± 11.87         | 0.05     |
| Мужчины, <i>n</i> (%)                                      | 131 (27.6)                 | 160 (29.9)            | 0.234    |
| Женщины, <i>n</i> (%)                                      | 344 (72.4)                 | 375 (70.1)            |          |
| Индекс массы тела (ИМТ) (кг/м <sup>2</sup> ), среднее ± SD | 26.40 ± 1.99               | 30.94 ± 5.82          | < 0.0001 |
| Ожирение и избыточная масса тела, <i>n</i> (%)             | 105 (22.11)                | 451 (84.30)           | < 0.0001 |
| Длительность СД2, медиана [Q1; Q3]                         | —                          | 6.22 [2; 17]          | —        |
| Артериальная гипертензия, <i>n</i> (%)                     | —                          | 449 (84.0)            | —        |
| Сердечно сосудистые заболевания, <i>n</i> (%)              | —                          | 193 (36.1)            | —        |
| HbA <sub>1c</sub> (%), медиана [Q1; Q3]                    | —                          | 7.5 [7.00; 14.00]     | —        |
| Глюкоза натощак (ммоль/л), медиана [Q1; Q3]                | 4.80 [3.20; 5.90]          | 7.21 [6.1; 16.00]     | < 0.0001 |
| Общий холестерин (ммоль/л), медиана [Q1; Q3]               | 4.50 [3.30; 6.12]          | 5.43 [3.20; 10.70]    | 0.0002   |
| ЛПНП (ммоль/л), медиана [Q1; Q3]                           | 2.70 [0.79; 3.99]          | 3.06 [0.93; 7.83]     | < 0.001  |
| ЛПВП (ммоль/л), медиана [Q1; Q3]                           | 1.10 [0.87; 1.40]          | 1.20 [0.32; 3.60]     | 0.05     |
| Триглицериды (ммоль/л), медиана [Q1; Q3]                   | 1.32 [1.10; 2.07]          | 1.68 [1.15; 3.71]     | 0.001    |

Примечание. ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, Std. dv. — стандартное отклонение, HbA<sub>1c</sub> — гликированный гемоглобин.

Исследование одобрено комитетом по этике ИБГ УФИЦ РАН. От всех участников исследования получали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях.

ДНК выделяли из венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Исследование полиморфных маркеров проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим расщеплением соответствующими эндонуклеазами рестрикции *BstF5I* (для ОНП *rs7158663* гена *MEG3*) и *BstH1I* (для *rs3741219* гена *H19*) [5]. Генотипирование локусов генов *MALAT*, *LINC02227* и *LINC00305* осуществляли с помощью аллель-специфической ПЦР. Праймеры для локуса *rs619586* гена *MALAT* – F: 5'- AAAGTCCGCCATTTTGCCAC-3', R: 5'-TGAATGCAAACTACACATGCAGA-3', A-аллеля – 5'-CTTGTGTTCTCTTGAGGGACACT-3', G-аллеля – 5'-AAGGTGGTAAACTATACCTG-3'; локуса *rs2850711* гена *LINC00305* F: 5'-TGAGAGGCTCTAATGGGACC-3', R: 5'-TCCCATTAATTCCCAACCCACT-3', G: 5'-AAAGATGAGCTTTGCTGTCTG-3', A: 5'-ACTCAAACCTTCCSTAAGCATTACT-3'; локуса *rs2850711* гена *LINC00305* – F: 5'-ACACATGGACAAGAAGCATCAC-3', R: 5'-CCTCTCCCATGTGTTTCCCA-3', A: 5'-AGATCTGAGCAGATCGGTGTTA-3', T: 5'-AAAATCCGGATTGTTCTACCTGA-3'.

Оценку соответствия частоты генотипов и аллелей равновесию Харди–Вайнберга проводили с помощью критерия  $\chi^2$ . Анализ ассоциаций с развитием заболевания проводили с использованием программы PLINK v.1.9 [20]. Поправку на множественность сравнения  $P_{FDR}$  оценивали с помощью онлайн калькулятора <https://www.sdmproject.com/utilities/?show=FDR>. Ассоциация считалась значимой при уровне  $P_{FDR}$  менее 0.05, а 95% CI не пересекал единицу. Анализ ассоциаций, рассчитанных для основной группы, представлен в моделях: кодоминантной и аддитивной, а также в виде аллельного теста. Количественные параметры оценивали с применением критерия Манна–Уитни. Множественный логистический регрессионный анализ и ROQ-анализ проводились с использованием GraphPad Prism 8.4.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение генотипов и аллелей ОНП генов днРНК *MEG3 rs7158663*, *H19 rs3741219*, *MALAT rs619586*, *LINC02227 rs2149954*, *LINC00305 rs2850711*, *CDKN2B-AS1 rs4977574* в контрольной группе соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (табл. 2). Первоначально мы провели анализ распределения генотипов и аллелей полиморфных локусов генов днРНК у пациентов с СД2 и в

контрольной группе. Статистически значимые различия при сравнении групп пациентов и контроля были получены для локусов *LINC02227 rs2149954*, *LINC00305 rs2850711*, *CDKN2B-AS1 rs4977574* в кодоминантной и аддитивной моделях, а также в аллельном тесте.

Ассоциация с развитием СД2 для локуса *rs2149954* гена *LINC02227* в аддитивной модели: OR = 0.76 (CI95% 0.62–0.93),  $P = 0.0083$ ,  $P_{FDR} = 0.017$ . Рисковыми являются генотипы CC–CT OR = 2.14 (CI95% 1.34–3.42),  $P = 0.001$  ( $P_{FDR} = 0.004$ ) (табл. 2). Ассоциация с развитием СД2 показана для локуса *rs2850711* гена *LINC00305* в аддитивной модели OR = 1.43 (CI95% 1.14–1.80),  $P = 0.0017$ ,  $P_{FDR} = 0.004$ . Рисковым является аллель T, в аллельном тесте показатель OR составил 1.52 (CI95% 1.20–1.93),  $P = 0.0001$ ,  $P_{FDR} = 0.0003$ . Ассоциация показана для локуса *rs4977574* гена *CDKN2B-AS1* OR = 0.43 (CI95% 0.30–0.61),  $P = 0.0001$ . Анализ распределения генотипов и аллелей локуса *rs4977574* гена *CDKN2B-AS1* выявил снижение частоты генотипа AA среди пациентов, в данном случае генотипами риска являются варианты GG–AG, показатель OR для вариантов риска составил 1.89 (CI95% 1.36–2.59),  $P = 0.0001$ ,  $P_{FDR} = 0.0003$ .

Далее мы провели анализ в зависимости от наличия ожирения. Анализ проводился в группе пациентов. Данные представлены в табл. 3. Ассоциация с ожирением была показана для локусов *rs7158663* гена *MEG3* в аддитивной модели: аллель риска G ( $P = 0.04$ ,  $P_{FDR} = 0.07$ ), а также *rs619586* гена *MALAT* в кодоминантной и аддитивной моделях: аллель риска G ( $P = 0.029$ ,  $P_{FDR} = 0.07$  и  $P = 0.018$ ,  $P_{FDR} = 0.05$  соответственно). Также ожирение ассоциировано с *rs2149954* гена *LINC02227*, генотипами риска являются CC–CT варианты ( $P = 0.0011$ ,  $P_{FDR} = 0.008$ ), а для генотипа TT и аллеля T установлено протективное значение в кодоминантной и аддитивной моделях ( $P = 0.0011$ ,  $P_{FDR} = 0.008$  и  $P = 0.0014$ ,  $P_{FDR} = 0.008$  соответственно). Для локуса *rs2850711* и *LINC00305* ассоциация определена в аддитивной модели: аллель риска T ( $P = 0.03$ ,  $P_{FDR} = 0.07$ ). Однако не все полученные различия достигали статистической значимости при поправке на множественность.

Для выявления ассоциации с тяжестью, осложнениями, вызванными СД2, нами проведен анализ данных локусов в зависимости от количественных характеристик СД2 и сопутствующей заболеваемости. С повышенным уровнем С-пептида ассоциированы: генотип AG локуса *rs619586* гена *MALAT* ( $P = 0.017$ ), генотип TT локуса *rs2850711* гена *LINC00305* ( $P = 0.00001$ ), генотип AA локуса *rs4977574* гена *CDKN2B-AS1* ( $P = 0.027$ ) (табл. 4). Повышенный уровень общего холестерина и ЛПНП был установлен для носителей генотипа AA локуса *rs619586* гена *MALAT* ( $P = 0.01$  и  $P = 0.012$ ). Повышенный уровень глюкозы, определяемой

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей генов днРНК в группе пациентов СД2 и в контроле

| Ген, поли-морфизм   | Генотип, аллель                 | Контроль, (%)                         | СД2, (%)                               | OR (95% CI)                                  | <i>P</i> | <i>P</i> <sub>H-W</sub> | <i>P</i> <sub>FDR</sub> |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| MEG3 rs7158663      | Кодоминантная<br>AA<br>AG<br>GG | 177 (37.3)<br>210 (44.2)<br>88 (18.5) | 208 (38.9)<br>239 (44.7)<br>88 (16.4)  | 1.00<br>0.97 (0.74–1.27)<br>0.85 (0.60–1.22) | 0.67     | 0.071                   | 0.79                    |
|                     | Аллельный тест<br>A<br>G        | 564 (59.0)<br>386 (41.0)              | 655 (61.0)<br>415 (39.0)               | 1.08 (0.91–1.29)                             | 0.42     |                         | 0.61                    |
|                     | Аддитивный                      | —                                     | —                                      | 0.94 (0.78–1.12)                             | 0.47     |                         | 0.63                    |
| H19 rs3741219       | Кодоминантная<br>TT<br>CT<br>CC | 176 (37)<br>211 (44.4)<br>88 (18.5)   | 199 (37.2)<br>228 (42.6)<br>108 (20.2) | 1.00<br>0.96 (0.73–1.26)<br>1.09 (0.77–1.54) | 0.76     | 0.087                   | 0.80                    |
|                     | Аллельный тест<br>T<br>C        | 563 (59.0)<br>387 (41.0)              | 626 (59.0)<br>444 (41.0)               | 0.97 (0.81–1.16)                             | 0.76     |                         | 0.80                    |
|                     | Аддитивный                      | —                                     | —                                      | 1.04 (0.88–1.24)                             | 0.63     |                         | 0.79                    |
| MALAT1 rs619586     | Кодоминантная<br>AA<br>AG<br>GG | 429 (90.3)<br>44 (9.3)<br>2 (0.4)     | 461 (86.8)<br>69 (13)<br>1 (0.2)       | 1.00<br>1.46 (0.98–2.18)<br>0.47 (0.04–5.15) | 0.14     | 0.34                    | 0.24                    |
|                     | Аллельный тест<br>A<br>G        | 902 (95.0)<br>48 (5.0)                | 991 (93.0)<br>71 (7.0)                 | 0.74 (0.51–1.08)                             | 0.14     |                         | 0.24                    |
|                     | Аддитивный                      | —                                     | —                                      | 1.25 (0.85–1.85)                             | 0.25     |                         | 0.39                    |
| LINCO2227 rs2149954 | Кодоминантная<br>CC<br>CT<br>TT | 172 (36.2)<br>219 (46.1)<br>84 (17.7) | 234 (44.1)<br>265 (50)<br>31 (5.8)     | 1.00<br>0.89 (0.68–1.16)<br>0.27 (0.17–0.43) | 0.0001   | 0.34                    | <b>0.0003</b>           |
|                     | Аллельный тест<br>C<br>T        | 563 (59.0)<br>387 (41.0)              | 733 (69.0)<br>327 (31.0)               | 0.65 (0.54–0.78)                             | 0.00001  |                         | <b>0.00006</b>          |
|                     | Аддитивный                      | —                                     | —                                      | 0.76 (0.62–0.93)                             | 0.0083   |                         | <b>0.017</b>            |

Таблица 2. Окончание

| Ген,<br>полиморфизм         | Генотип, аллель                                      | Контроль,<br>(%)                       | СД2,<br>(%)                           | OR<br>(95% CI)                               | <i>P</i> | <i>P</i> <sub>H-W</sub> | <i>P</i> <sub>FDR</sub> |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| <i>LINC00305</i> rs2850711  | Кодоминантная<br><i>AA</i><br><i>AT</i><br><i>TT</i> | 355 (74.7)<br>106 (22.3)<br>14 (3)     | 362 (67.7)<br>132 (24.7)<br>41 (7.7)  | 1.00<br>1.22 (0.91–1.64)<br>2.87 (1.54–5.36) | 0.0014   | 0.088                   | <b>0.003</b>            |
|                             | Аллельный тест<br><i>A</i><br><i>T</i>               | 816 (86.0)<br>134 (14.0)               | 856 (80.0)<br>214 (20.0)              | 1.52 (1.20–1.93)                             | 0.0001   |                         | <b>0.0003</b>           |
|                             | Аддитивный                                           | —                                      | —                                     | 1.43 (1.14–1.80)                             | 0.0017   |                         | <b>0.004</b>            |
| <i>CDKN2B-AS1</i> rs4977574 | Кодоминантная<br><i>GG</i><br><i>AG</i><br><i>AA</i> | 124 (26.1)<br>225 (47.4)<br>126 (26.5) | 188 (35.1)<br>265 (49.5)<br>82 (15.3) | 1.00<br>0.78 (0.58–1.04)<br>0.43 (0.30–0.61) | 0.0001   | 0.27                    | <b>0.0003</b>           |
|                             | Аллельный тест<br><i>G</i><br><i>A</i>               | 473 (50.0)<br>477 (50.0)               | 641 (60.0)<br>429 (40.0)              | 0.66 (0.55–0.79)                             | 0.00001  |                         | <b>0.00006</b>          |
|                             | Аддитивный                                           | —                                      | —                                     | 0.70 (0.58–0.84)                             | 0.0001   |                         | <b>0.0003</b>           |

Примечание.  $P_{H-W}$  – уровень значимости при определении равновесия Харди–Вайнберга для контрольной группы,  $P_{FDR}$  – уровень значимости с учетом множественных сравнений. Жирным отмечены статистически значимые различия.

натошак, выявлен среди носителей генотипа *AA* локуса *rs2850711* гена *LINC00305* ( $P = 0.023$ ). Осложнение постинфарктный кардиосклероз чаще встречался у пациентов с генотипами *GG* локуса *rs7158663* гена *MEG3*: OR = 4.91 (CI95% 1.34 – 17.94), ( $P = 0.02$ ) и у пациентов с генотипами *TT* локуса *rs2850711* гена *LINC00305* ( $P = 0.005$ ). Гипертония чаще встречалась у пациентов с генотипами *GG–AG* гена *CDKN2B-AS1* *rs4977574* ( $P = 0.03$ ) и среди носителей вариантов *CT–TT* локуса *rs2149954* гена *LINC02227* ( $P = 0.05$ ).

При анализе ROC-кривых для оценки прогностической значимости выявленных рисков значений в развитии СД2 были построены две модели, для первой модели были учтены только полиморфные локусы: *MEG3* *rs7158663*, *H19* *rs3741219*, *MALAT* *rs619586*, *LINC02227* *rs2149954*, *LINC00305* *rs2850711*, *CDKN2B-AS1* *rs4977574*, во вторую модель были включены эти же локусы, а также такие переменные, как пол, возраст обследуемых и ИМТ.

Эффективность прогноза измеряли с использованием площади под кривой (AUC). ROC-анализ показал AUC, равную 66.5% (95%CI 63.90–69.40) для модели, включающей только исследуемые полиморфные варианты. Для второй модели AUC составила 95.30% (95%CI 93.50–97.40) с чувствительностью 98.0% и специфичностью 97.0%, что указывает на высокую способность показателей, включенных в анализ, правильно классифицировать индивидов с СД2 и здоровых.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы большое внимание уделяется исследованию роли некодирующих частей генома человека в развитии заболеваний, особенно это касается онкологических заболеваний [21]. В настоящее время идет активное исследование днРНК с риском развития метаболических расстройств, таких как ожирение, инсулинорезистентность,

Таблица 3. Ассоциация исследованных локусов генов днРНК с ожирением

| Ген, полиморфизм            | Модель        | Генотип                             | Контроль             | Ожирение             | OR (95% CI)                                  | <i>P</i> | <i>P</i> <sub>FDR</sub> |
|-----------------------------|---------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------|----------|-------------------------|
| <i>MEG3 rs7158663</i>       | Кодоминантная | <i>AA</i><br><i>AG</i><br><i>GG</i> | 36.3<br>44.7<br>19.9 | 42.6<br>44.8<br>13.8 | 1.00<br>1.21 (0.86–1.71)<br>1.68 (1.03–2.72) | 0.18     | 0.27                    |
|                             | Аддитивная    | —                                   | —                    | —                    | 1.36 (1.01–1.82)                             | 0.04     | 0.12                    |
| <i>H19 rs3741219</i>        | Кодоминантная | <i>TT</i><br><i>CT</i><br><i>CC</i> | 38.8<br>42.6<br>18.7 | 36.5<br>46.7<br>16.8 | 1.00<br>0.96 (0.61–1.5)<br>1.16 (0.82–1.66)  | 0.58     | 0.63                    |
|                             | Аддитивная    | —                                   | —                    | —                    | 1.01 (0.81–1.26)                             | 0.94     | 0.94                    |
| <i>MALAT rs619586</i>       | Кодоминантная | <i>AA</i><br><i>AG</i><br><i>GG</i> | 89.3<br>10.3<br>0.4  | 86.9<br>12.8<br>0.2  | 1.00<br>1.81 (1.06–3.10)<br>NA               | 0.029    | 0.07                    |
|                             | Аддитивная    | —                                   | —                    | —                    | 2.33 (1.11– 4.90)                            | 0.018    | 0.05                    |
| <i>LINC02227 rs2149954</i>  | Кодоминантная | <i>CC</i><br><i>CT</i><br><i>TT</i> | 36.4<br>49.3<br>14.3 | 44.4<br>49.5<br>6.1  | 1.00<br>0.82 (0.59–1.16)<br>0.35 (0.20–0.60) | 0.0011   | 0.008                   |
|                             | Аддитивная    | —                                   | —                    | —                    | 0.66 (0.51–0.85)                             | 0.0014   | 0.008                   |
| <i>LINC00305 rs2850711</i>  | Кодоминантная | <i>AA</i><br><i>AT</i><br><i>TT</i> | 78.5<br>19.6<br>1.9  | 72.3<br>22.7<br>5    | 1.00<br>1.26 (0.85–1.87)<br>2.84 (0.98–8.23) | 0.062    | 0.124                   |
|                             | Аддитивная    | —                                   | —                    | —                    | 1.41 (1.02–1.94)                             | 0.03     | 0.07                    |
| <i>CDKN2B-AS1 rs4977574</i> | Кодоминантная | <i>GG</i><br><i>AG</i><br><i>AA</i> | 27.8<br>49.8<br>22.5 | 32.6<br>47.4<br>20   | 1.00<br>0.81 (0.56–1.18)<br>0.76 (0.48–1.19) | 0.41     | 0.49                    |
|                             | Аддитивная    | —                                   | —                    | —                    | 0.87 (0.69–1.08)                             | 0.21     | 0.28                    |

Примечание. См. табл. 2.

СД2 [22]. В данном исследовании мы впервые выявили ассоциацию полиморфных локусов генов *LINC02227 rs2149954* и *LINC00305 rs2850711* с развитием СД2, ожирения, а также с осложнениями, вызванными СД2. *LINC02227 rs2149954* – данный полиморфный вариант ассоциирован с долголетием по результатам GWAS [23], также данный локус сцеплен с ОНП *rs9313772*, ассоциированным с гипертонией и ишемической болезнью сердца (ИБС). *LINC02227* – это длинная межгенная некодирующая РНК 2227. Согласно данным базы <https://regulomedb.org/>, полиморфизму *rs2149954* соответствует ранг 1f, указывающий на функциональную значимость данного ОНП (eQTL/caQTL + TF binding / chromatin accessibility peak). Для аллеля *T* установлено повышение уровня экспрессии в жировой ткани, селезенке, крови по данным GTEx проекта (<https://www.gtexportal.org/>). Также показано, что данный участок является значимым при

взаимодействии с такими факторами транскрипции как FOXA1, HNF4A. Известно, что данные транскрипционные факторы вовлечены в регуляцию экспрессии гена *GLUT2*, переносчика глюкозы [24].  
*LINC00305* является днРНК, относится к классу межгенных, кодирует РНК 305, а также участвует в активации моноцитов, индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов, участвует в регуляции апоптоза. Данный ген входит в генную сеть репрессора арилгидрокарбонового рецептора (AHR), участника NF-κB-сигналинга. Полиморфный вариант *rs2850711* передается сцепленным в одном кластере, состоящем в общей сложности из 16 SNP, один из сцепленных вариантов (*rs2850687*) является связывающим регионом для USF2 (Upstream Transcription Factor 2). Продукт гена *USF2* участвует в метаболизме липидов, усиливает активность фактора транскрипции SREBP1c [25].

**Таблица 4.** Анализ полиморфных вариантов генов днРНК с клиническими характеристиками пациентов

| Маркер           | Полиморфный локус                                       | Медиана (Q1; Q3)                        | <i>P</i> |
|------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------|
| С-пептид         | <i>MALAT rs619586</i><br><i>AG</i><br><i>AA</i>         | 4.49 (6.32; 2.92)<br>2.19 (2.28; 1.9)   | 0.017    |
|                  | <i>LINC00305 rs2850711</i><br><i>AA-AT</i><br><i>TT</i> | 2.28 (2.11; 2.34)<br>10.3 (4.87; 15.28) | 0.00001  |
|                  | <i>CDKN-AS rs4977574</i><br><i>GG-AG</i><br><i>AA</i>   | 2.27 (2.37; 2.47)<br>4.57 (2.27; 6.91)  | 0.027    |
| Общий холестерин | <i>MALAT rs619586</i><br><i>AA</i><br><i>AG</i>         | 5.54 (4.92; 5.63)<br>5.02 (4.88; 5.17)  | 0.01     |
| ЛПНП             | <i>MALAT rs619586</i><br><i>AA</i><br><i>AG</i>         | 3.2 (2.98; 3.34)<br>2.57 (2.22; 2.89)   | 0.012    |
| Глюкоза натощак  | <i>LINC00305 rs2850711</i><br><i>AA</i><br><i>AT-TT</i> | 7.38 (7.11; 7.68)<br>6.64 (6.45; 6.89)  | 0.023    |

Локус *rs2850711* гена *LINC00305* ассоциирован с развитием атеросклероза [26]. Уровень экспрессии гена *LINC00305* выше у носителей аллеля *T* для генотипов *AT* и *TT* по сравнению с носителями аллеля *A* в гомозиготном состоянии [27]. Повышенная экспрессия гена *LINC00305* была выявлена у пациентов с атеросклерозом и ревматоидным артритом, так же как и ассоциация аллеля *T* с риском развития этих заболеваний [27, 28]. Ранее было установлено, что повышенная экспрессия *LINC00305* модулирует (повышает) экспрессию генов воспаления [29].

Для локуса *rs4977574* гена днРНК *CDKN2B-AS1* (*ANRIL*) показана ассоциация как с сердечно-сосудистыми осложнениями при СД2, так и с риском развития СД2 [30]. Авторы в мета-анализе показали, что аллель *G* локуса *rs4977574* обуславливает увеличение уровней ЛПНП у европейцев и, соответственно, предрасположенность к ИБС [31], так же как и среди популяций Азии носители аллеля *G* имеют повышенный риск развития ишемической болезни сердца [32]. Вопрос остается дискуссионным по поводу функциональной значимости полиморфного локуса *rs4977574* гена *CDKN2B-AS1*. Рядом авторов выдвинуто предположение, что аллель *G* приводит к образованию линейных изоформ молекулы *ANRIL* наряду со снижением экспрессии кольцевых транскриптов *ANRIL*. Линейные изоформы *ANRIL* вызывают репрессию генов опухолевых супрессоров — *CDKN2A* и *CDKN2B* [33]. В конечном итоге это приводит к ингибированию апоптоза и чрезмерной пролиферации проатерогенных

клеток. Вместо этого *A*-аллель может способствовать усиленному образованию кольцевых изоформ *ANRIL*. Транскрипты гена *ANRIL* такого типа ингибируют активность комплекса *ReBoW*, необходимого для созревания рРНК. Это, в свою очередь, приводит к дефициту рРНК, ядрышковому стрессу и активации белка *p53*, что приводит к ингибированию деления клеток и активации апоптоза. С другой стороны, показано, что аллель *G* локуса *rs4977574* снижает риск развития рака простаты и ИБС среди иранцев [34], программа *HaploReg v4* предсказывает, что данный локус изменяет сайты связывания с транскрипционными факторами *ETS* и глюкокортикоидного рецептора (*GR*) [35].

Показана роль глюкокортикоидного рецептора в развитии гипергликемии и диабета [36]. Так, повышенная экспрессия глюкокортикоидного рецептора была выявлена у мышей с диабетом, тогда как отсутствие глюкокортикоидного рецептора в гепатоцитах мышей останавливает развитие гипергликемии, это позволяет предположить, что изменение связывания глюкокортикоидного рецептора с участком *9p21* является значимым в развитии диабетической гипергликемии, что было подтверждено настоящим исследованием, тогда как развитие ожирения не ассоциировано с данным локусом. Ассоциация с диабетом для генов *CDKN2A/2B* показана и по результатам проведенных широкогоеномных исследований [37]. Механизмы этого влияния вероятно заключаются в изменении способности к пролиферации бета-клеток поджелудочной железы под действием продуктов

этих генов с возрастом. днРНК *CDKN2B-AS1* способствует усилению пролиферации клеток и снижению апоптоза, а также является участником развития воспалительного ответа [38].

В нашем исследовании локус *rs619589* гена *MALAT1* ассоциирован с уровнем С-пептида, холестерина, ЛПНП и ожирением. *MALAT1* — длинная некодирующая РНК — играет роль в развитии различных видов рака, метаболических и других заболеваний. По данным некоторых авторов, аллель *G* обуславливает снижение экспрессии *MALAT1* в клетках сердца, крови и опухолей [39, 40]. Программа HaploReg v4 предсказывает, что данный локус изменяет сайты связывания для транскрипционных факторов HNF1 и PLZF, принимающих участие в контроле основных биологических процессов, включая энергетический обмен, выработку глюкозы в печени и развитие гипергликемии [41, 42]. Так, аллель *A* связывается с Erythroid-Related Factor (ERF), тогда как аллель *G* не связывается. В настоящем исследовании носители аллеля *G* имели сниженный уровень холестерина, сниженный уровень ЛПНП и сниженный уровень С-пептида, что подтверждает данные Wang G. с соавт. о протективном эффекте аллеля *G* при развитии ишемической болезни сердца [43].

Нами выявлена ассоциация локусов генов днРНК в аддитивной модели — *LINC02227 rs2149954* ( $P_{FDR} = 0.017$ ), *LINC00305 rs2850711* ( $P_{FDR} = 0.004$ ) и *CDKN2B-AS1 rs4977574* ( $P_{FDR} = 0.0003$ ), с риском развития СД2. Для локуса *rs2850711* гена *LINC00305* выявлена ассоциация с уровнем глюкозы натощак ( $P = 0.023$ ), уровнем С-пептида ( $P = 0.00001$ ); для локусов *LINC02227 rs2149954* и *CDKN2B-AS1 rs4977574* установлена ассоциация с гипертонией. Локус *MALAT1 rs619586* ассоциирован с уровнем С-пептида ( $P = 0.017$ ), ЛПНП ( $P = 0.012$ ) и общим холестерином ( $P = 0.01$ ). Для локуса *CDKN2B-AS1 rs4977574* показана ассоциация с уровнем С-пептида ( $P = 0.027$ ). Локус *LINC02227 rs2149954* ( $P_{FDR} = 0.008$ ) ассоциирован с ожирением, локус *rs7158663* гена *MEG3* — с постинфарктным кардиосклерозом ( $P = 0.02$ ). Локус *rs3741219* гена *H19* не продемонстрировал ассоциации ни с показателями инсулинорезистентности, ни с ожирением. Проведена оценка ROC-кривых в развитии СД2. Для модели, включающей шесть локусов генов днРНК, был получен показатель AUC, равный 66.5% (95%CI 63.90–69.40), для второй модели, в которую были включены эти же локусы, а также такие переменные, как пол, возраст обследуемых и ИМТ, AUC составил 95.3% (95%CI 93.5–97.4) с чувствительностью 98.0% и специфичностью 97.0%, что указывает на высокую способность показателей, включенных в анализ, правильно классифицировать индивидов с СД2 и здоровых. Таким образом показано, что на развитие СД2 оказывают влияние как вариабельность генов

днРНК, так и такие «средовые факторы», как пол, возраст, а также наличие ожирения и избыточной массы тела. Для подтверждения выводов необходимо проведение исследования в других группах.

Исследование поддержано Российским научным фондом (№22-25-00010).

Исследование одобрено Этическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН, протокол № 8 от 14.03.2012.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные — совершеннолетние.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Татосян К.А., Зиневич Л.С., Демин Д.Э., Шварц А.М. Функциональные особенности длинных некодирующих РНК, содержащих последовательности мобильных генетических элементов // Мол. биология. 2020. Т. 54. № 5. С. 718–724. DOI: 10.31857/S0026898420050109
2. Ji E., Kim C., Kim W., Lee E.K. Role of long non-coding RNAs in metabolic control // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Gene Regulatory Mechanisms. 2020. V. 1863. № 4. P. 194348. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.12.006>
3. Mahajan A., Taliun D., Thurner M. et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps // Nature Genetics. 2018. V. 50. № 11. P. 1505–1513. doi: 10.1038/s41588-018-0241-6
4. Pulit S.L., Stoneman C., Morris A.P. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry // Hum. Mol. Genet. 2019. V. 28. № 1. P. 166–174. doi: 10.1093/hmg/ddy327
5. Ghaedi H., Zare A., Omrani M.D. et al. Genetic variants in long noncoding RNA *H19* and *MEG3* confer risk of type 2 diabetes in an Iranian population // Gene. 2018. V. 675. P. 265–271. doi: 10.1016/j.gene.2018.07.002
6. Bak R.O., Mikkelsen J.G. miRNA sponges: Soaking up miRNAs for regulation of gene expression // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2014. V. 5. № 3. P. 317–333. doi: 10.1002/wrna.1213
7. Ding G.L., Wang F.F., Shu J. et al. Transgenerational glucose intolerance with *Igf2/H19* epigenetic alterations in mouse islet induced by intrauterine hyperglycemia

- // Diabetes. 2012. V. 61. № 5. P. 1133–1142.  
doi: 10.2337/db11-1314
8. Ding H., Wang F., Shi X. *et al.* LncRNA *MALAT1* induces the dysfunction of  $\beta$  cells via reducing the histone acetylation of the PDX-1 promoter in type 1 diabetes // Experimental and Mol. Pathology. 2020. V. 114. doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104432
9. Zeggini E., Weedon M.N., Lindgren C.M. *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes // Science. 2007. V. 316. № 5829. P. 1336–1341. doi: 10.1126/science.1142364
10. Xiao M., Bai S., Chen J. *et al.* CDKN2B-AS1 participates in high glucose-induced apoptosis and fibrosis via NOTCH2 through functioning as a miR-98-5p decoy in human podocytes and renal tubular cells // Diabetology & Metabolic Syndrome. 2021. V. 13. № 1. P. 1–12. doi: 10.1186/s13098-021-00725-5
11. Huang K., Zhong J., Li Q. *et al.* Effects of CDKN2B-AS1 polymorphisms on the susceptibility to coronary heart disease // Mol. Genet. & Genomic Med. 2019. V. 7. № 11. doi.org/10.1002/mgg3.955
12. Li H., Han S., Sun Q. *et al.* Long non-coding RNA CDKN2B-AS1 reduces inflammatory response and promotes cholesterol efflux in atherosclerosis by inhibiting ADAM10 expression // Aging (Albany NY). 2019. V. 11. № 6. P. 1695. doi: 10.18632/aging.101863
13. Foss-Skiftesvik J., Li S., Rosenbaum A. *et al.* Multi-ancestry genome-wide association study of 4069 children with glioma identifies 9p21.3 risk locus // Neuro-Oncology. 2023. V. 25. № 9. P. 1709–1720. doi: 10.1093/neuonc/noad042
14. Deelen J., Beekman M., Uh H.W. *et al.* Genome-wide association meta-analysis of human longevity identifies a novel locus conferring survival beyond 90 years of age // Hum. Mol. Genet. 2014. V. 23. № 16. P. 4420–4432. doi: 10.1093/hmg/ddu139
15. Martin S., Cule M., Basty N. *et al.* Genetic evidence for different adiposity phenotypes and their opposing influences on ectopic fat and risk of cardiometabolic disease // Diabetes. 2021. V. 70. № 8. P. 1843–1856. doi: 10.2337/db21-0129
16. Zhang D.D., Wang W.T., Xiong J. *et al.* Long noncoding RNA *LINC00305* promotes inflammation by activating the AHRN-NF- $\kappa$ B pathway in human monocytes // Sci. Reports. 2017. V. 7. № 1. doi: 10.1038/srep46204
17. Dedov I., Shestakova M., Benedetti M.M. *et al.* Prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in the adult Russian population (NATION study) // Diabetes Res. and Clin. Practice. 2016. V. 115. P. 90–95. doi: 10.1016/j.diabres.2016.02.010
18. Алфёрова В.И., Мустафина С.В. Распространенность ожирения во взрослой популяции Российской Федерации // Ожирение и метаболизм. 2022. Т. 19. № 1. С. 96–105. <https://doi.org/10.14341/omet12809>
19. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю. и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом // Сахарный диабет. 2022. Т. 24. № 1S. С. 1–148. DOI: 10.14341/DM20171S8
20. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. *et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. DOI: <https://doi.org/10.1086/519795>
21. Cao L., Yan G., Yu S. *et al.* Associations of *MALAT1* and its functional single nucleotide polymorphisms with cancer // Pathology-Res. and Practice. 2022. V. 236. doi: 10.1016/j.prp.2022.153988
22. Yang W., Lyu Y., Xiang R., Yang J. The role of genetic variants in the long non-coding RNA genes *MALAT1* and *H19* in the pathogenesis of childhood obesity, long non-coding RNAs in the pathogenesis of insulin resistance // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 24. doi: 10.3390/ijms232416054
23. Wain L.V., Verwoert G.C., O'Reilly P.F. *et al.* Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure // Nat. Genetics. 2011. V. 43. № 10. P. 1005–1011. doi: 10.1038/ng.922
24. David-Silva A., Freitas H.S., Okamoto M.M. *et al.* Hepatocyte nuclear factors 1 $\alpha$ /4 $\alpha$  and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats // Life Sci. 2013. V. 93. № 22. P. 805–813. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.011
25. Czech M.P., Tencerova M., Pedersen D.J., Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage // Diabetologia. 2013. V. 56. P. 949–964. doi: 10.1007/s00125-013-2869-1
26. Castellanos-Rubio A., Ghosh S. Disease-associated SNPs in inflammation-related lncRNAs // Front. Immunol. 2019. V. 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00420
27. Wahba A.S., Ibrahim M.E., Mesbah N.M. *et al.* Serum LINC00305 expression and its genetic variant rs2850711 are associated with clinical and laboratory features of rheumatoid arthritis // Brit. J. Biomed. Sci. 2020. V. 77. № 3. P. 142–147. doi: 10.1080/09674845.2020.1744942
28. O'Donnell C.J., Cupples L.A., D'Agostino R.B. *et al.* Genome-wide association study for subclinical atherosclerosis in major arterial territories in the NHLBI's Framingham Heart Study // BMC Med. Genet. 2007. V. 8. P. 1–12. doi: 10.1186/1471-2350-8-S1-S4

29. Zhang D-D., Wang W-T., Xiong J. et al. Long noncoding RNA *LINC00305* promotes inflammation by activating the AHRR-NF- $\kappa$ B pathway in human monocytes // Sci. Reports. 2017. V. 7. № 1. <https://doi.org/10.1038/srep46204>
30. Rivera N.V., Carreras-Torres R., Roncarati R. et al. Assessment of the 9p21.3 locus in severity of coronary artery disease in the presence and absence of type 2 diabetes // BMC Med. Genet. 2013. V. 14. P. 1–8. doi: 10.1186/1471-2350-14-11
31. Wei B., Liu Y., Li H. et al. Effect of 9p21.3 (lncRNA and CDKN2A/2B) variant on lipid profile // Front. in Cardiovascular Med. 2022. V. 9. doi: 10.3389/fcvm.2022.946289
32. Altshuler D., Anand S.S., Andersen K. et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease // Nat. Genet. 2011. V. 43. № 4. P. 333–338. doi: 10.1038/ng.784
33. Xu B., Fang Z., He S. et al. ANRIL polymorphism rs4977574 is associated with increased risk of coronary artery disease in Asian populations: A meta-analysis of 12,005 subjects // Medicine. 2018. V. 97. № 39. doi: 10.1097/MD.00000000000012641
34. Taheri M., Pouresmaeili F., Omrani M.D. et al. Association of *ANRIL* gene polymorphisms with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in an Iranian population // Biomarkers in Medicine. 2017. V. 11. № 5. P. 413–422. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0378>
35. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // Nucl. Ac. Res. 2016. V. 44. № D1. P. D877–D881. doi.org/10.1093/nar/gkv1340
36. Kokkinopoulou I., Diakoumi A., Moutsatsou P. Glucocorticoid receptor signaling in diabetes // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 20. doi: 10.3390/ijms222011173
37. Kong Y., Sharma R.B., Nwosu B.U., Alonso L.C. Islet biology, the *CDKN2A/B* locus and type 2 diabetes risk // Diabetologia. 2016. V. 59. № 8. P. 1579–1593. doi: 10.1007/s00125-016-3967-7
38. Holdt L.M., Teupser D. Long Noncoding RNA *ANRIL*: Lnc-ing genetic variation at the chromosome 9p21 locus to molecular mechanisms of atherosclerosis // Front. in Cardiovascular Med. 2018. V. 5. doi: 10.3389/fcvm.2018.00145
39. Li Q., Zhu W., Zhang B. et al. The *MALAT1* gene polymorphism and its relationship with the onset of congenital heart disease in Chinese // Biosci. Rep. 2018. V. 38. № 3. doi: 10.1042/BSR20171381
40. Zheng J., Pang C.H., Du W. et al. An allele of rs619586 polymorphism in *MALAT1* alters the invasiveness of meningioma via modulating the expression of collagen type V alpha (COL5A1) // J. Cel. Mol. Med. 2020. V. 24. № 17. P. 10223–10232. doi.org/10.1111/jcmm.15637
41. Chen S., Qian J., Shi X. et al. Control of hepatic gluconeogenesis by the promyelocytic leukemia zinc finger protein // Mol. Endocrin. 2014. V. 28. № 12. P. 1987–1998. doi: 10.1210/me.2014-1164
42. Kavitha B., Ranganathan S., Gopi S. et al. Molecular characterization and re-interpretation of *HNF1A* variants identified in Indian MODY subjects towards precision medicine // Front. in Endocrin. 2023. V. 14. doi: 10.3389/fendo.2023.1177268
43. Wang G., Li Y., Peng Y. et al. Association of polymorphisms in *MALAT1* with risk of coronary atherosclerotic heart disease in a Chinese population // Lipids in Health and Disease. 2018. V. 17. P. 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0728-2>

## Polymorphic Variants of Long Non-Coding RNA Genes in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus

O. V. Kochetova<sup>1, \*</sup>, D. Sh. Avzaleydinova<sup>2</sup>, T. M. Kochetova<sup>2</sup>, T. V. Viktorova<sup>2</sup>, G. F. Korytina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, 450054 Russia

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia

\*e-mail: Olga\_MK78@mail.ru

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a disease characterized by increased blood glucose, formed as a result of impaired mechanisms of insulin binding to cells. DNA samples of patients with T2DM ( $N = 535$ ) and healthy individuals ( $N = 475$ ) were used. We identified the association of lncRNA gene loci *LINC02227 rs2149954* (OR = 0.76,  $P = 0.0083$ ,  $P_{FDR} = 0.017$ ), *LINC00305 rs2850711* (OR = 1.43,  $P = 0.0017$ ,  $P_{FDR} = 0.004$ ) and *CDKN2B-AS1 rs4977574* (OR = 0.70,  $P = 0.0001$ ,  $P_{FDR} = 0.0003$ ) in an additive model with T2DM. The *LINC00305* gene locus *rs2850711* showed association with fasting glucose level ( $P = 0.023$ ), C-peptide level ( $P = 0.00001$ ), *LINC02227 rs2149954* and *CDKN2B-AS1 rs4977574* loci showed association with hypertension. *MALAT rs619586* gene polymorphism was associated with C-peptide ( $P = 0.017$ ), LDL ( $P = 0.012$ ) and total cholesterol levels ( $P = 0.01$ ). *CDKN2B-AS1 rs4977574* gene polymorphism showed association with C-peptide levels ( $P = 0.027$ ). *SNP LINC02227 rs2149954* was associated with obesity ( $P = 0.0011$ ,  $P_{FDR} = 0.008$ ). *MEG3 rs7158663* gene polymorphism was associated with post infarct atherosclerosis ( $P = 0.02$ ). ROC curve analysis showed that the studied loci and variables such as sex, age of subjects and BMI level, included in the construction of the risk calculation model, could predict the development of T2DM with a sensitivity of 98.0% and specificity of 97.0%, the area under the AUC curve was 95.30% (95%CI 93.50–97.40).

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, long non-coding RNAs, single nucleotide polymorphisms.

УДК 575:599.9

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК (*H19*, *MEG3*, *MALAT1*, *LINC00305*, *LINC00261*, *LINC02227* И *CDKN2B-AS1*) С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

© 2024 г. Г. Ф. Корытина<sup>1,2,\*</sup>, Л. З. Ахмадишина<sup>1,3</sup>, В. А. Маркелов<sup>1,2</sup>,  
Т. Р. Насибуллин<sup>1</sup>, Ю. Г. Азнабаева<sup>2</sup>, О. В. Кочетова<sup>1</sup>, Н. Н. Хуснутдинова<sup>1</sup>,  
А. П. Ларкина<sup>1</sup>, Н. Ш. Загидуллин<sup>2</sup>, Т. В. Викторова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

<sup>3</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, 450006 Россия

\*e-mail: guly\_kory@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2024 г.

После доработки 09.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — это хроническое заболевание, возникающее в результате динамических, кумулятивных ген–средовых взаимодействий, результатом которых является повреждение легочной ткани и изменение ее нормального функционирования, связанное с ускоренным клеточным старением. Длинные некодирующие РНК (днРНК) являются важными эпигенетическими регуляторами различных аспектов клеточного старения. Цель настоящего исследования — выявление ассоциации полиморфных вариантов генов днРНК *H19*, *MEG3*, *MALAT1*, *LINC00305*, *LINC00261*, *CDKN2B-AS*, *LINC02227* с ХОБЛ. В работе были использованы образцы ДНК больных ХОБЛ ( $N = 703$ ) и здоровых индивидов ( $N = 655$ ), полиморфные локусы анализировали методом ПЦР в реальном времени. Ассоциация с развитием ХОБЛ была установлена для генов *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *LINC02227* (rs2149954), *MALAT1* (rs619586) и *CDKN2B-AS1* (rs4977574). Полигенный анализ позволил выявить информативные ген–генные комбинации, включающие полиморфные варианты днРНК и генов, кодирующих компоненты молекулярных каскадов, связанных с клеточным старением и апоптозом. По результатам множественного регрессионного и ROC-анализа получена прогностическая модель формирования ХОБЛ, в которую вошли ген–генные комбинации и индекс курения ( $P = 4.01 \times 10^{-48}$ , AUC = 0.87).

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, длинные некодирующие РНК, клеточное старение, полигенный анализ, *H19*, *MEG3*, *LINC02227*, *CDKN2B-AS1*.

DOI: 10.31857/S0016675824090094 EDN: ADLQWZ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — это тяжелое хроническое заболевание, характеризуется стойким и прогрессирующим ограничением воздушного потока в дыхательных путях вследствие развития эмфиземы и обструктивного бронхита и бронхиолита [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в настоящее время заболеваемость ХОБЛ превышает 250 млн человек, она является третьей ведущей причиной смерти в мире. В 2060 г. прогнозируемый показатель смертности от ХОБЛ будет составлять более 5.4 млн смертей ежегодно [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)]. В

Российской Федерации наблюдается отчетливый долгосрочный тренд роста заболеваемости данной патологией: так, за 2021-й год было зафиксировано более трех миллионов случаев ХОБЛ [2]. ХОБЛ возникает в результате динамических, кумулятивных и повторяющихся в течение жизни ген–средовых взаимодействий, результатом которых является повреждение легочной ткани и изменение ее нормального функционирования [3]. Развитие ХОБЛ связано с различными факторами, такими как табакокурение, загрязнение воздуха, профессиональное воздействие, генетические и эпигенетические факторы [4]. Длинные некодирующие РНК (днРНК) являются транскриптами, которые

имеют длину более 200 нуклеотидов и не кодируют белок, функционируют как важные регуляторы различных биологических процессов, таких как альтернативный сплайсинг, деградация РНК, ингибирование мРНК, энхансинг и сайленсинг транскрипции, ремоделирование хроматина, посттрансляционная модификация структуры белков [5]. В ряде исследований показано, что в легочной ткани больных ХОБЛ дифференциально экспрессируются днРНК, многие из которых участвуют в регуляции различных аспектов клеточного старения [6]. Развитие и прогрессирование ХОБЛ могут быть связаны как с изменением экспрессии днРНК, так и с нарушением их функционирования вследствие генетического полиморфизма. Вклад полиморфизма днРНК и взаимодействия с генами, белковые продукты которых вовлечены в регуляцию клеточного старения и окислительного стресса и в молекулярный патогенез ХОБЛ, недостаточно изучен. Цель настоящего исследования — выявление ассоциации полиморфных вариантов генов регуляторных днРНК *H19*, *MEG3*, *MALAT1*, *LINC00305*, *LINC00261*, *CDKN2B-AS*, *LINC02227* с развитием ХОБЛ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования — кандидатное исследование по принципу случай — контроль. Использовали образцы ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Исследование одобрено комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН (протокол № 17 от 07.12.2010) и ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 19, от 01.11.2022). От всех участников получали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях. Все пациенты с ХОБЛ были госпитализированы в отделение пульмонологии Городской клинической больницы № 21 г. Уфы. Диагноз ХОБЛ устанавливали с учетом рекомендаций рабочей группы по “Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких” (<http://goldcopd.org>) на основании клинических и лабораторно-инструментальных исследований, включая компьютерную томографию высокого разрешения, спирометрию. В рамках клинико-инструментального обследования у всех участников были оценены показатели внешнего дыхания (жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>), соотношение ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ), определена доля курящих пациентов с вычислением индекса курения. Группа больных включала 703 индивида (из них 627 мужчин (86.195%) и 76 женщин (10.81%)), средний возраст составил  $63.04 \pm 12.02$  лет. Среди больных

ХОБЛ курильщиков и бывших курильщиков — 590 человек (83.93%), некурящих 113 (16.08%). Индекс курения у курильщиков составил  $43.08 \pm 25.75$  пачек/лет. В группе больных показатели (в % от нормы) составляли: ОФВ<sub>1</sub> ( $41.99 \pm 19.0$ ), ФЖЕЛ ( $56.65 \pm 22.71$ ), ЖЕЛ ( $58.09 \pm 21.59$ ), ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ ( $62.29 \pm 20.98$ ).

В контрольную группу вошли неродственные индивиды, не имевшие хронических заболеваний в анамнезе, в том числе болезней органов дыхания, а также острых респираторных заболеваний на момент сбора биоматериала. Критериями включения в контрольную группу являлись нормальные показатели функции внешнего дыхания (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ > 70%, ОФВ<sub>1</sub> > 80%) и возраст старше 45 лет. Группа контроля включала 655 индивидов (из них 582 мужчины (88.85%) и 73 женщины (11.15%)), средний возраст составил  $60.67 \pm 11.31$ , курильщики и бывшие курильщики — 552 (84.27%) и некурящие — 103 (15.73%); индекс курения составлял  $39.75 \pm 25.87$  пачек/лет.

**Генотипирование.** ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Гены и SNP для анализа были выбраны в соответствии со следующими критериями: имеющие функциональную значимость и/или ранее показаны ассоциацией с другими многофакторными заболеваниями человека, частотой редких аллелей (MAF)  $\geq 5\%$  в популяциях европеоидов по данным базы the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Для исследования были выбраны следующие полиморфные локусы генов днРНК: *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *MALAT1* (rs619586), *LINC00305* (rs2850711), *LINC00261* (rs6048205), *CDKN2B-AS1* (rs4977574), *LINC02227* (rs2149954). Функциональная значимость SNP исследовалась по базам RegulomeDB Version 1.1 (<https://regulomedb.org>), SNPinfo Web Server (<https://snpinfo.niehs.nih.gov>) и HaploReg v3 [7], данные представлены в табл. 1. Полиморфные варианты генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени коммерческими наборами с флуоресцентной детекцией (<https://www.oligos.ru>, ООО “ДНК-Синтез”, Россия) на приборе BioRad CFX96™ (“BioRad Laboratories”, Inc, USA). Подробно методы анализа описаны нами ранее [8].

**Статистическая обработка результатов.** Описание стандартных методов статистического анализа приведено нами ранее [8]. Анализ отклонения полученных частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга и анализ ассоциаций отдельных SNP с заболеванием проводили с использованием пакета SNPAssoc v 2.0–2 для R [9]. Полиморфный маркер считали ассоциированным с признаком при  $P < 0.05$ , поправку на множественное тестирование проводили с помощью метода оценки доли

Таблица 1. Биоинформатический анализ функциональных характеристик, отобранных для исследования полиморфных локусов длинных некодирующих РНК

| Ген<br>RefSNP<br>HGVS Names                           | Хромосомная<br>позиция | Регуляторный |                  | Промоторы<br>гистоновых<br>меток | Энхансеры<br>гистоновых<br>меток | ДНКаза            | Регуляторные<br>белки | Мотивы       | ТФ | Expression<br>QTLs<br>(Haplo Reg,<br>GTEx portal) |
|-------------------------------------------------------|------------------------|--------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|--------------|----|---------------------------------------------------|
|                                                       |                        | ранг         | коэф-<br>фициент |                                  |                                  |                   |                       |              |    |                                                   |
| <i>H19</i> rs3741219<br>g.7447 T > C                  | 11p15.5                | 4            | 0.70497          | 8 тканей                         | 5 тканей                         | 11<br>тканей      | –                     | NRSE,<br>YY1 |    | 19 тканей<br>(в т. ч.<br>легкие)                  |
| <i>MEG3</i> rs7158663<br>g.21819 A > G                | 14q32.2                | 1f           | 0.19549          | –                                | –                                | Кожа              | –                     | 5            | да | Кровь,<br>артерии                                 |
| <i>MALAT1</i><br>rs619586<br>g.65266169<br>A > G      | 11q13.1                | 1a           | 0.99267          | 23 ткани                         | Селезенка                        | 48<br>тканей      | 4 вида                | 4            | да | 14 тканей                                         |
| <i>LINC00305</i><br>rs2850711<br>g.61787038 A > T     | 18q22.1                | 4            | 0.60906          | –                                | –                                | –                 | –                     | –            | –  | –                                                 |
| <i>LINC00261</i><br>rs6048205<br>g.22578963<br>A > G  | 20p11.21               | 4            | 0.60906          | 11 тканей                        | 11 тканей                        | 10<br>тканей      | 5 видов               | 14           | да | 3 ткани                                           |
| <i>CDKN2B-AS1</i><br>rs4977574<br>g.22098574<br>A > G | 9p21.3                 | 2c           | 0.70567          | Жировая<br>ткань                 | 11 тканей                        | 4 ткани           | –                     | Ets, GR      |    | Кровь,<br>гипофиз                                 |
| <i>LINC02227</i><br>rs2149954<br>g.157820602<br>G > A | 5q33.3                 | 1f           | 0.55436          | –                                | 4 ткани                          | Печень,<br>сосуды | 4 вида                | COMP1        | –  | –                                                 |

Примечание. RefSNP согласно базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), функциональная значимость SNP исследовалась по базам RegulomeDB Version 1.1 (<https://regulomedb.org/>), SNPinfo Web Server (<https://snpinf0.nih.gov/>), HaploReg v3, GTEx (<https://www.gtexportal.org/>). ДНКаза – чувствительный к ДНКазе регион; мотивы – измененные регуляторные мотивы для связывания с регуляторами транскрипции; ТФ – сайты связывания с транскрипционными факторами; регуляторные белки – участки связывания с регуляторными белками, Expression QTLs – expression Quantitative Trait Locus.

Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфных локусов генов днРНК в группах больных ХОБЛ и здоровых индивидов

| Ген<br>RefSNP <sup>1</sup>              | Редкий<br>аллель | Генотипы,<br>аллели | ХОБЛ<br><i>n</i> (%)<br>( <i>N</i> = 703) | Контроль<br><i>n</i> (%)<br>( <i>N</i> = 655) | <i>P</i>                | OR (95%CI)       |
|-----------------------------------------|------------------|---------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|------------------|
| <i>H19</i><br>rs3741219 T > C           | C                | TT/TC/CC            | 282/282/139<br>(40.11/40.11/19.77)        | 216/311/128<br>(32.98/47.48/19.54)            | 0.011                   | —                |
|                                         |                  | T/C                 | 846/560<br>(60.17/39.83)                  | 743/567<br>(56.72/43.28)                      | 0.074                   | 0.86 (0.74–1.01) |
| <i>MEG3</i><br>rs7158663 A > G          | G                | AA/AG/GG            | 335/262/106<br>(47.65/37.27/15.08)        | 212/310/133<br>(32.37/47.33/20.31)            | 1.24 x 10 <sup>-5</sup> | —                |
|                                         |                  | A/G                 | 932/474<br>(66.29/33.71)                  | 734/576<br>(56.03/43.97)                      | 1.14 x 10 <sup>-5</sup> | 0.64 (0.55–0.75) |
| <i>MALAT1</i><br>rs619586<br>A > G      | G                | AA/AG/GG            | 629/72/2<br>(89.47/10.24/0.28)            | 607/47/1<br>(92.67/7.18/0.15)                 | 0.117                   | —                |
|                                         |                  | A/G                 | 1 330/76<br>(94.59/5.41)                  | 1 261/49<br>(96.26/3.74)                      | 0.048                   | 1.47 (1.02–2.12) |
| <i>LINC00305</i><br>rs2850711 A > T     | T                | AA/AT/TT            | 423/232/48<br>(60.17/33.00/6.83)          | 375/234/46<br>(57.25/35.73/7.02)              | 0.537                   | —                |
|                                         |                  | A/T                 | 1 078/328<br>(76.67/23.33)                | 984/326<br>(75.11/24.89)                      | 0.366                   | 0.91 (0.77–1.09) |
| <i>LINC00261</i><br>rs6048205<br>A > G  | G                | AA/AG/GG            | 574/112/17<br>(81.65/15.93/2.42)          | 536/109/10<br>(81.83/16.64/1.53)              | 0.482                   | —                |
|                                         |                  | A/G                 | 1 260/146<br>(89.62/10.38)                | 1 181/129<br>(90.15/9.85)                     | 0.689                   | 1.06 (0.82–1.36) |
| <i>LINC02227</i><br>rs2149954 G > A     | A                | GG/GA/AA            | 284/361/58<br>(40.40/51.35/8.25)          | 243/320/92<br>(37.10/48.85/14.05)             | 0.003                   | —                |
|                                         |                  | G/A                 | 929/477<br>(66.07/33.93)                  | 806/504<br>(61.53/38.47)                      | 0.015                   | 0.82 (0.70–0.96) |
| <i>CDKN2B-AS1</i><br>rs4977574<br>A > G | G                | AA/AG/GG            | 219/344/140<br>(31.15/48.93/19.91)        | 161/329/165<br>(24.58/50.23/25.19)            | 0.008                   | —                |
|                                         |                  | A/G                 | 782/624<br>(55.62/44.38)                  | 651/659<br>(49.69/50.31)                      | 0.002                   | 0.78 (0.67–1.47) |

Примечание. *P* – значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов (тест  $\chi^2$  на однородность выборок); OR (95%CI) – показатель отношения шансов для редкого аллеля и 95%-ный доверительный интервал (базовый аллельный тест).

ложноположительных результатов False Discovery Rate (FDR), используя онлайн-ресурс (<https://tools.carbocation.com/FDR>). Поиск ген-генных сочетаний, ассоциированных с заболеванием, проводили с использованием метода Монте-Карло и цепей Маркова с помощью программного обеспечения APSampler (<http://sourceforge.net/projects/apsampler/>) [10]. При построении предиктивных моделей использовали метод логистической регрессии с пошаговым включением переменных, в качестве которых выбирались ген-генные сочетания, полиморфные варианты отдельных генов и клинико-демографические параметры; для оценки эффективности прогностических моделей вычисляли площадь под кривой (AUC – area under the curve); расчеты проводили с помощью программы SPSS v. 22.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В сформированных выборках пациентов с ХОБЛ и контрольной группе проведен анализ семи полиморфных локусов генов днРНК: *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *MALAT1* (rs619586), *LINC00305* (rs2850711), *LINC00261* (rs6048205), *CDKN2B-AS1* (rs4977574), *LINC02227* (rs2149954). Биоинформатический анализ функциональных характеристик, отобранных для исследования полиморфных локусов днРНК, показал, что большинство SNP оказывали влияние на экспрессию гена или были сцеплены с функциональными локусами гена (табл. 1).

Прежде чем приступить к анализу ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов с развитием ХОБЛ нами были рассчитаны частоты

**Таблица 3.** Статистически значимые результаты анализа ассоциации полиморфных локусов днРНК с ХОБЛ

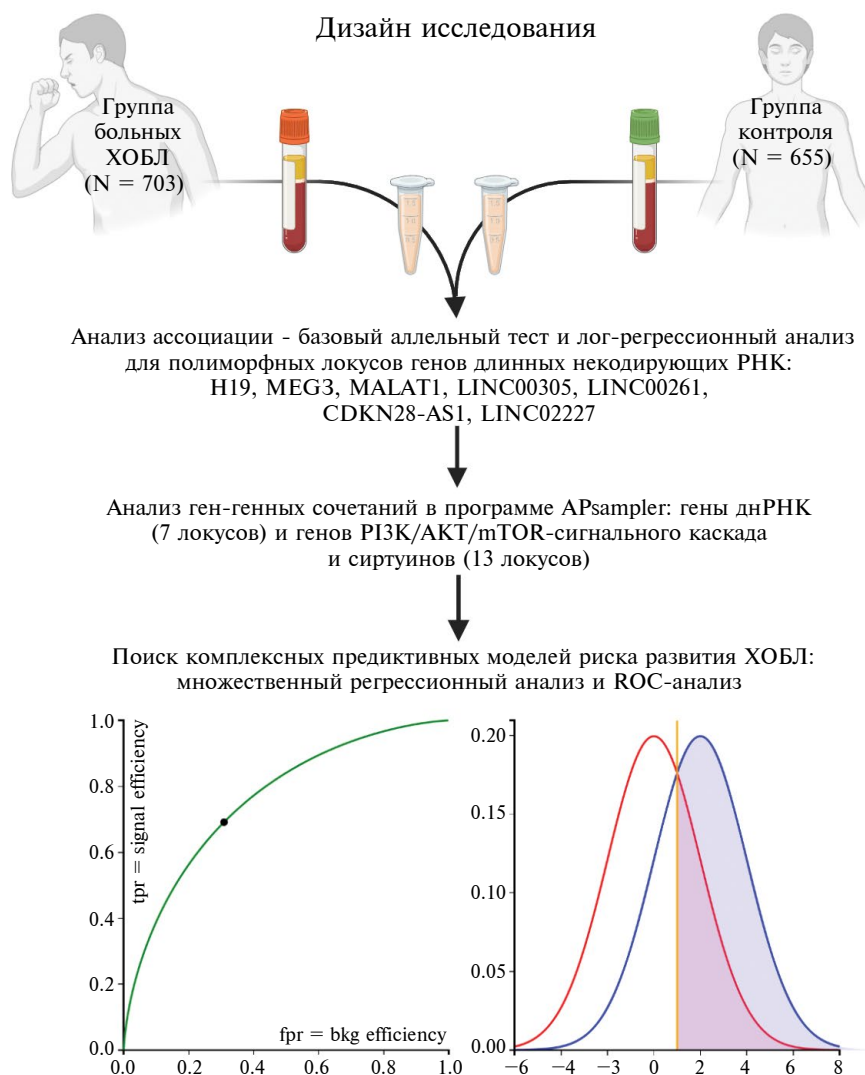
| Ген, SNP                                | Редкий аллель | N    | Генотип, модель             | OR <sub>adj</sub> (95%CI) | P <sub>adj</sub>         | P <sub>cor-FDR</sub>     |
|-----------------------------------------|---------------|------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>H19</i><br>rs3741219<br>T > C        | C             | 1358 | ТТ<br>ТС+СС,<br>доминантная | 1.00<br>0.74 (0.57–0.96)  | 0.022                    | 0.022                    |
|                                         |               |      | ТТ+СС<br>СТ                 | 1.00<br>0.74 (0.57–0.96)  | 0.021                    | 0.022                    |
| <i>MEG3</i><br>rs7158663<br>A > G       | G             | 1358 | АА<br>АГ+ГГ,<br>доминантная | 1.00<br>0.54 (0.42–0.70)  | 2.167 x 10 <sup>-6</sup> | 1.733 x 10 <sup>-5</sup> |
|                                         |               |      | лог-аддитивная              | 0.68 (0.57–0.81)          | 1.471 x 10 <sup>-5</sup> | 5.884 x 10 <sup>-5</sup> |
| <i>LINC02227</i><br>rs2149954<br>G > A  | A             | 1358 | ГГ+ГА<br>АА,<br>рецессивная | 1.00<br>0.55 (0.38–0.81)  | 0.00171                  | 0.0045                   |
|                                         |               |      | лог-аддитивная              | 0.81 (0.67–0.96)          | 0.0165                   | 0.022                    |
| <i>CDKN2B-AS1</i><br>rs4977574<br>A > G | G             | 1358 | АА<br>АГ+ГГ,<br>доминантная | 1.00<br>0.72 (0.55–0.95)  | 0.018                    | 0.022                    |
|                                         |               |      | лог-аддитивная              | 0.79 (0.66–0.94)          | 0.0077                   | 0.0154                   |

Примечание. N – количество индивидов, включенных в регрессионный анализ; P<sub>adj</sub> – значимость для теста отношения правдоподобия лог-регрессионной модели с учетом пола, возраста, статуса и индекса курения; OR<sub>adj</sub> – отношение шансов с учетом всех факторов, 95%CI – 95%-ный доверительный интервал для OR; P<sub>cor-FDR</sub> – значимость теста после коррекции (Benjamini-Hochberg FDR Adjusted P-value); лог-аддитивная модель на дозу редкого аллеля – увеличение дозы редкого аллеля в ряду: гомозигота по частому аллелю (0) – гетерозигота (1) – гомозигота по редкому аллелю (2).

аллелей и генотипов в группах и соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (табл. 2). Выявленные частоты генотипов всех исследованных полиморфных локусов в группе контроля находились в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга: *H19* (rs3741219) ( $P_{\text{Х-В}} = 0.4715$ ), *MEG3* (rs7158663) ( $P_{\text{Х-В}} = 0.2863$ ), *MALAT1* (rs619586) ( $P_{\text{Х-В}} = 0.5317$ ), *LINC00305* (rs2850711) ( $P_{\text{Х-В}} = 0.3033$ ), *LINC00261* (rs6048205) ( $P_{\text{Х-В}} = 0.2288$ ), *CDKN2B-AS1* (rs4977574) ( $P_{\text{Х-В}} = 1$ ), *LINC02227* (rs2149954) ( $P_{\text{Х-В}} = 0.4817$ ).

Далее проведена оценка статистической значимости различий между группами по распределению частот аллелей и генотипов и рассчитаны показатели отношения шансов для редкого аллеля каждого локуса (базовый аллельный тест). На

следующем этапе методом логистической регрессии анализировали ассоциацию отдельных полиморфных локусов с учетом количественных и бинарных признаков (пол, возраст, статус и индекс курения), вводимых в уравнение регрессии в качестве независимых переменных (табл. 3). Учитывая, что при многофакторных заболеваниях вклад отдельных генов в развитие заболевания может быть небольшим, с использованием программы APSampler проводили поиск информативных ген-генных сочетаний, ассоциированных с ХОБЛ. На заключительном этапе с использованием метода множественного регрессионного анализа с пошаговым включением предикторов и последующего ROC-анализа проводили поиск комплексных клинико-генетических моделей риска развития ХОБЛ (рис. 1).



**Рис. 1.** Дизайн исследования.

*Анализ ассоциации отдельных полиморфных вариантов генов днРНК с развитием ХОБЛ*

Статистически значимые различия по распределению частот аллелей и/или генотипов между группами больных ХОБЛ и контроля были выявлены по генам *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *MALAT1* (rs619586), *LINC02227* (rs2149954), *CDKN2B-AS1* (rs4977574) (табл. 2).

Ассоциация локуса *H19* (rs3741219) с развитием ХОБЛ была установлена в доминантной модели ( $P_{\text{adj}} = 0.022$ ; OR = 0.74), маркером риска являлся гомозиготный по частому аллелю генотип ТТ ( $P_{\text{adj}} = 0.022$ ; OR = 1.36, 95%CI 1.11–1.69).

Локус *MEG3* (rs7158663) значимо ассоциировал с ХОБЛ в доминантной ( $P_{\text{adj}} = 2.167 \times 10^{-6}$ ; OR = 0.54) и лог-аддитивной ( $P_{\text{adj}} = 1.471 \times 10^{-5}$ ; OR = 0.68) моделях; риск развития заболевания связан с генотипом АА ( $P_{\text{adj}} = 2.167 \times 10^{-6}$ ; OR = 1.90, 95%CI 1.52–2.37).

Локус *LINC02227* (rs2149954) ассоциировал с ХОБЛ в рецессивной ( $P_{\text{adj}} = 0.00171$ ; OR = 0.55) и лог-аддитивной ( $P_{\text{adj}} = 0.0165$ ; OR = 0.81) моделях; маркером риска выступал частый аллель G ( $P = 0.015$ ; OR = 1.22, 95%CI 1.04–1.42).

Ассоциация гена *CDKN2B-AS1* (rs4977574) с ХОБЛ была установлена в доминантной ( $P_{\text{adj}} = 0.018$ ; OR = 0.72) и лог-аддитивной ( $P_{\text{adj}} = 0.0077$ ; OR = 0.79) моделях; маркером риска являлся гомозиготный по частому аллелю генотип АА ( $P_{\text{adj}} = 0.018$ ; OR = 1.39, 95%CI 1.09–1.76).

Ассоциация ХОБЛ с локусом *MALAT1* (rs619586) была выявлена только в базовом аллельном тесте, частота редкого аллеля G составила 5.41% в группе больных и 3.74% в контроле ( $P = 0.048$ ; OR = 1.47, 95%CI 1.02–2.12), однако регрессионный анализ не выявил значимых ассоциаций ни в одной из моделей, что связано с низкой частотой аллеля G.

Статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов *LINC00305* (rs2850711) и *LINC00261* (rs6048205) между больными ХОБЛ и контрольной группой выявлено не было.

Таким образом, в результате анализа отдельных полиморфных локусов генов днРНК нами впервые получены данные по ассоциации генов *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *LINC02227* (rs2149954), *CDKN2B-AS1* (rs4977574) с ХОБЛ.

*Анализ ген–генных сочетаний полиморфных локусов генов днРНК и генов PI3K/АКТ/ mTOR-сигнального каскада и НАД-зависимых деацетилаз семейства сиртуинов*

Выбранные для исследования днРНК выступают в качестве регуляторов различных молекулярных каскадов, связанных с процессами клеточного

старения, окислительного стресса и апоптоза, поэтому целесообразным было рассмотреть комбинированный вклад полиморфных локусов днРНК и ранее исследованных нами генов PI3K/АКТ/ mTOR-сигнального каскада и НАД-зависимых деацетилаз семейства сиртуинов [11]. В анализ включали 20 SNP, из них семь — днРНК, исследованных в настоящей работе, и 13 SNP ранее изученных нами генов *PIK3R1*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*, *SIRT2*, *SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6* [11]. Получено 8192 уникальных паттерна, из которых мы исключили комбинации, не содержащие аллели/генотипы исследованных нами днРНК. Далее критериями отбора выявленных сочетаний были  $P_{\text{FDR}} < 0.01$  и OR > 2 (для маркеров повышенного риска). Всего было отобрано 33 ген–генных сочетания, которые соответствовали выбранному критерию, из них 15 ассоциировали с риском развития ХОБЛ, 18 были протективными. В табл. 4 представлены 12 наиболее значимых ген–генных комбинаций, ассоциированных с ХОБЛ.

Самые значимые комбинации риска развития ХОБЛ определялись сочетанием генотипа GG гена *SIRT3* (rs536715) с аллелем G локуса *LINC02227* (rs2149954) (OR = 2.31;  $P_{\text{FDR}} = 1.12 \times 10^{-8}$ ) и генотипом АА локуса *MEG3* (rs7158663) (OR = 2.37;  $P_{\text{FDR}} = 1.77 \times 10^{-6}$ ).

Однако большинство выявленных комбинаций риска включали аллель G гена *PIK3R1* (rs3730089) в сочетании с аллелями днРНК — *LINC00305* (rs2850711) — аллель А, *CDKN2B-AS1* (rs4977574) — аллель А и *MALAT1* (rs619586) — аллель G. Наиболее значимая комбинация, которая ассоциирована с пониженным риском развития ХОБЛ, включала аллель А гена *PIK3R1* (rs831125) в сочетании с аллелем А локуса *SIRT3* (rs3782116), генотипом AG локуса *SIRT3* (rs536715) и аллель А локуса *LINC00261* (rs6048205) (OR = 0.16;  $P_{\text{FDR}} = 4.88 \times 10^{-10}$ ). Коровым компонентом наиболее значимых протективных ген–генных паттернов являлась комбинация аллелей А локусов *SIRT3* (rs3782116) и *SIRT3* (rs536715) с аллелем А гена *LINC00261* (rs6048205) и аллелем А *MALAT1* (rs619586).

Следующие три комбинации включали аллель G гена *MEG3* (rs7158663) в сочетании с генотипом ТТ локуса *PIK3R1* (rs10515070) и аллелем А локуса *PIK3R1* (rs3730089) (OR = 0.34;  $P_{\text{FDR}} = 3.01 \times 10^{-7}$ ); с генотипом TC локуса *SIRT6* (rs107251) (OR = 0.37;  $P_{\text{FDR}} = 3.12 \times 10^{-7}$ ) и одно из сочетаний включало аллель G гена *CDKN2B-AS1* (rs4977574), совместно с аллелями Т генов *MTOR* (rs2295080) и *SIRT6* (rs107251) (OR = 0.28;  $P_{\text{FDR}} = 6.61 \times 10^{-7}$ ).

Итак, мы видим, что полиморфные локусы *MEG3* (rs7158663), *MALAT1* (rs619586), *CDKN2B-AS1* (rs4977574) в ген–генных комбинациях проявляли аллель-специфическое действие, когда одни аллели были частью комбинаций, предрасполагающей

Таблица 4. Ген–генные комбинации полиморфных локусов генов днРНК, генов Р1ЗК/АКТ/mtTOR–сигнального каскада и НАД–зависимых деацетилаз, наиболее значимо ассоциированные с развитием ХОБЛ

| Ген–генные комбинации                                                                                                 | ХОБЛ<br>(частота) | Контроль<br>(частота) | <i>P</i>                 | <i>P</i> <sub>FDR</sub>  | OR    | 95%CI       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------|-------------|
| Протективные                                                                                                          |                   |                       |                          |                          |       |             |
| <i>PIK3R1</i> (rs831125) A + <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) AG + <i>LINC00261</i> (rs6048205) A | 4.0               | 21.0                  | 2.03 x 10 <sup>-12</sup> | 4.88 x 10 <sup>-10</sup> | 0.16  | 0.087–0.287 |
| <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A + <i>LINC00261</i> (rs6048205) A + <i>MALAT1</i> (rs619586) A  | 6.80              | 25.80                 | 2.56 x 10 <sup>-11</sup> | 2.52 x 10 <sup>-9</sup>  | 0.23  | 0.14–0.37   |
| <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A + <i>MALAT1</i> (rs619586) A                                   | 8.0               | 24.23                 | 1.53 x 10 <sup>-10</sup> | 8.05 x 10 <sup>-9</sup>  | 0.26  | 0.16–0.40   |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) G + <i>PIK3R1</i> (rs10515070) TT + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) A                               | 9.31              | 23.08                 | 2.09 x 10 <sup>-8</sup>  | 3.01 x 10 <sup>-7</sup>  | 0.34  | 0.23–0.51   |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) G + <i>SIRT6</i> (rs107251) TC                                                                | 12.09             | 26.88                 | 2.19 x 10 <sup>-8</sup>  | 3.12 x 10 <sup>-7</sup>  | 0.37  | 0.26–0.53   |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) G + <i>MTOR</i> (rs2295080) T + <i>SIRT6</i> (rs107251) T + <i>CDKN2B-AS1</i> (rs4977574) G   | 6.94              | 20.78                 | 5.74 x 10 <sup>-8</sup>  | 6.61x10 <sup>-7</sup>    | 0.28  | 0.17–0.46   |
| Рисковые                                                                                                              |                   |                       |                          |                          |       |             |
| <i>SIRT3</i> (rs536715) GG + <i>LINC02227</i> (rs2149954) G                                                           | 63.00             | 42.41                 | 2.61 x 10 <sup>-10</sup> | 1.12 x 10 <sup>-8</sup>  | 2.31  | 1.77–3.01   |
| <i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>PTEEN</i> (rs701848) C + <i>LINC00305</i> (rs2850711) A                              | 52.11             | 33.33                 | 1.42 x 10 <sup>-7</sup>  | 1.35 x10 <sup>-6</sup>   | 2.178 | 1.62–2.92   |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) AA+ <i>SIRT3</i> (rs536715) GG                                                                | 30.79             | 15.80                 | 1.99 x 10 <sup>-7</sup>  | 1.77 x 10 <sup>-6</sup>  | 2.37  | 1.69–3.32   |
| <i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>SIRT3</i> (rs536715) G + <i>SIRT6</i> (rs107251) C + <i>LINC00305</i> (rs2850711) A  | 63.42             | 45.70                 | 2.06 x 10 <sup>-7</sup>  | 1.82 x 10 <sup>-6</sup>  | 2.06  | 1.56–2.72   |
| <i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>CDKN2B-AS1</i> (rs4977574) A                                                         | 20.36             | 9.65                  | 4.44 x 10 <sup>-6</sup>  | 2.2 x 10 <sup>-5</sup>   | 2.39  | 1.62–3.52   |
| <i>PIK3R1</i> (rs831125) A + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>MALAT1</i> (rs619586) G                                 | 8.06              | 3.38                  | 0.0008                   | 0.002                    | 2.75  | 1.47–5.14   |

к развитию ХОБЛ, а альтернативные аллели этих же полиморфных локусов присутствовали в комбинациях, связанных со сниженным риском заболевания. Необходимо отметить, что для *LINC00261* (rs6048205), *LINC00305* (rs2850711) и *MALAT1* (rs619586) значимые ассоциации проявились только при сочетании с генами *PIK3R1* и сиртуинов (*SIRT3* и *SIRT6*).

Таким образом, анализ ген–генных сочетаний исследованных полиморфных локусов днРНК и генов PI3K/АКТ/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов позволил выявить высокоинформативные комбинации, ассоциированные с развитием ХОБЛ, что может указывать на синергизм исследуемых генов.

*Поиск комплексных клинико-генетических моделей риска развития ХОБЛ с использованием множественного регрессионного анализа*

Проведен поиск комплексных моделей риска ХОБЛ методами множественного регрессионного анализа с пошаговым включением наиболее значимых переменных с последующим ROC-анализом для оценки эффективности полученных прогностических моделей. В качестве предикторов выбирали высокоинформативные ген–генные комбинации, идентифицированные на предыдущем этапе анализа, а также отдельные генотипы или аллели, выявленные при базовом анализе ассоциаций. Далее добавляли клинико-демографические переменные (пол, возраст, статус и индекс курения) и выбирали наиболее значимые предиктивные модели.

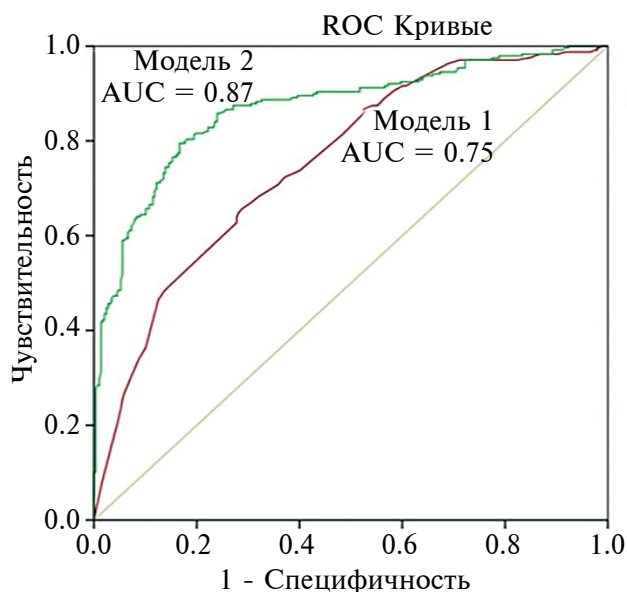
В первую высокоинформативную прогностическую модель риска формирования ХОБЛ вошли ген–генные комбинации и отдельные гены: генотип AA гена *LINC02227* (rs2149954) и аллель G гена *PIK3R1* (rs831125) ( $P = 8.86 \times 10^{-24}$ ) (табл. 5). ROC-анализ полученной модели показал ее умеренную предсказательную способность AUC = 0.75 (95%CI 0.71–0.80, чувствительность – 65.7%, специфичность – 71.2%) (рис. 2).

Вторая значимая прогностическая модель включала, помимо генетических маркеров, индекс курения и характеризовалась высокой предиктивной способностью ( $P = 4.01 \times 10^{-48}$ ) AUC = 0.87 (95%CI 0.84–0.90) (чувствительность – 74.9%, специфичность – 86.3%) (табл. 5, рис. 2), что указывает на возможность данной регрессионной модели эффективно дифференцировать больных с ХОБЛ и здоровых индивидов. В результате множественного регрессионного анализа была оценена прогностическая значимость выявленных маркеров и идентифицированы высокоинформативные комплексные модели риска ХОБЛ, учитывающие как генетические, так и средовые факторы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов генов днРНК *H19*, *MEG3*, *MALAT1*, *LINC00305*, *LINC00261*, *CDKN2B-AS*, *LINC02227* с ХОБЛ, изучен комбинированный вклад генов днРНК и ранее исследованных нами генов PI3K/АКТ/mTOR-сигнального каскада и НАД-зависимых деацетилаз семейства сиртуинов в развитии заболевания [11].

Установлена ассоциация локуса rs3741219 гена *H19* с ХОБЛ; маркером риска является генотип ТТ, тогда как у носителей редкого аллеля С риск снижен. Замена Т в положении rs3741219 на С приводит к созданию сайтов связывания для миРНК miR-146b-3p и miR-1539 и снижению уровня экспрессии *H19* у носителей аллеля С [12]. Согласно данным функционального анализа, полиморфный локус rs3741219 расположен на участке ДНК, который связывается с регуляторными белками NRSF и YY1; изменение уровня экспрессии, по данным портала GTEx и HaploReg v3, происходит в том числе и в легочной ткани. Ген *H19* (imprinted maternally expressed transcript) расположен на хромосоме 11p15.5, в уникальном кластере генов, известном как локус H19/IGF-2, который



**Рис. 2.** График площади под кривой (ROC-анализ) для оценки эффективности прогностических регрессионных моделей. AUC – площадь под кривой. Полные характеристики моделей представлены в табл. 5. Модель 1 – AUC = 0.75 (чувствительность – 65.7%, специфичность – 71.2%) включает только генетические маркеры; модель 2 – AUC = 0.87 (чувствительность – 74.9%, специфичность – 86.3%) включает генетические маркеры и индекс курения.

Таблица 5. Значимые предиктивные регрессионные модели развития ХОБЛ

| Предиктор                                                                                                             | <i>b</i> | <i>P</i> <sub>Вальд</sub> | OR    | 95%CI     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------|-------|-----------|
| Модель 1                                                                                                              |          |                           |       |           |
| <i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>SIRT3</i> (rs536715) G + <i>SIRT6</i> (rs107251) C + <i>LINC00305</i> (rs2850711) A  | 0.635    | 0.0014                    | 1.887 | 1.28–2.79 |
| <i>PIK3R1</i> (rs10515070) TT + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) A                                                           | –0.645   | 0.0039                    | 0.525 | 0.34–0.81 |
| <i>PIK3R1</i> (rs831125) G                                                                                            | 1.150    | 4x10 <sup>–8</sup>        | 3.158 | 2.09–4.76 |
| <i>LINC02227</i> (rs2149954) AA                                                                                       | –0.587   | 0.0499                    | 0.556 | 0.31–1.0  |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) AA + <i>SIRT3</i> (rs536715) GG                                                               | 0.468    | 0.0471                    | 1.597 | 1.01–2.53 |
| <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A + <i>LINC00261</i> (rs6048205) A                               | –1.239   | 0.0002                    | 0.29  | 0.15–0.55 |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) G + <i>MTOR</i> (rs2295080) T + <i>SIRT6</i> (rs107251) T + <i>CDKN2B-AS1</i> (rs4977574) G   | –1.298   | 0.0002                    | 0.273 | 0.14–0.54 |
| Константа                                                                                                             | –0.511   | 0.001                     | 0.600 |           |
| <i>P</i> = 8.86 x 10 <sup>–24</sup><br>AUC = 0.75 (95%CI 0.71–0.80) (чувствительность – 65.7%, специфичность – 71.2%) |          |                           |       |           |
| Модель 2                                                                                                              |          |                           |       |           |
| <i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>SIRT3</i> (rs536715) G + <i>SIRT6</i> (rs107251) C + <i>LINC00305</i> (rs2850711) A  | 0.521    | 0.0244                    | 1.684 | 1.07–2.65 |
| <i>PIK3R1</i> (rs10515070) TT + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) A                                                           | –0.813   | 0.0023                    | 0.444 | 0.26–0.75 |
| <i>PIK3R1</i> (rs831125) G                                                                                            | 1.436    | 6x10 <sup>–9</sup>        | 4.204 | 2.59–6.83 |
| <i>LINC02227</i> (rs2149954) AA                                                                                       | –0.814   | 0.0243                    | 0.443 | 0.22–0.9  |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) AA + <i>SIRT3</i> (rs536715) GG                                                               | 0.766    | 0.0067                    | 2.151 | 1.24–3.74 |
| <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A + <i>LINC00261</i> (rs6048205) A                               | –0.825   | 0.0224                    | 0.438 | 0.22–0.89 |
| <i>MEG3</i> (rs7158663) G + <i>MTOR</i> (rs2295080) T + <i>SIRT6</i> (rs107251) T + <i>CDKN2B-AS1</i> (rs4977574) G   | –1.184   | 0.0024                    | 0.306 | 0.14–0.66 |
| Индекс курения                                                                                                        | 0.067    | 4x10 <sup>–21</sup>       | 1.069 | 1.07–2.65 |
| Константа                                                                                                             | –2.529   | 7x10 <sup>–16</sup>       | 0.080 |           |
| <i>P</i> = 4.01 x 10 <sup>–48</sup><br>AUC = 0.87 (95%CI 0.84–0.90) (чувствительность – 74.9%, специфичность – 86.3%) |          |                           |       |           |

Примечание. *b* – бета-коэффициент для переменной; *P*<sub>Вальд</sub> – значимость для статистики Вальда (Wald statistic); OR – exp(*b*) отношение шансов и 95%CI – 95%-ный доверительный интервал для OR; *P* – значение для теста отношения правдоподобия (likelihood ratio (LR) test); AUC – площадь под кривой.

подвергается геномному импринтингу [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/283120/>]. *H19* играет роль ключевого компонента регуляторных сетей, вовлеченных в патогенез некоторых видов рака и фиброза, за счет стимуляции аутофагии, ингибирования апоптоза и усиления эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), активации сигнальных путей TGF- $\beta$ /SMAD3 и mTOR [13, 14]. Так, показано, что *H19* ингибирует miR-200a и стимулирует PDCD4 (programmed cell death 4), усиливая апоптоз клеток сосудов легких [15]. *H19*, ингибируя miR-19b-3p, стимулирует ферроптоз клеток легких посредством ферритина 1 [16]. *H19* стимулирует фиброзные изменения дыхательных путей, ингибируя компоненты PTEN/AKT – сигнального каскада [17]. *H19* связывает miR-29a-3p и активирует TNFRSF1A (TNF receptor superfamily member 1A), в результате чего нижележащие регуляторные молекулы стимулируют профибротический и воспалительный фенотипы легочной ткани [18]. Действуя как конкурентная эндогенная РНК (ceRNA), *H19* связывает широкий круг миРНК (miR-200a, miR-107, miR-17, miR-6515-3p, miR-138, miR-203), способствуя пролиферации, инвазии и метастазированию клеток рака легких [19]. Таким образом, повышенная экспрессия *H19* является неблагоприятным фактором развития целого спектра патологических состояний. Полиморфные локусы гена *H19* и, в частности rs3741219, широко исследовались при различных видах рака [20]. Исследования при других заболеваниях малочисленны, так показано отсутствие ассоциации локуса rs3741219 гена *H19* с развитием сахарного диабета второго типа [21].

Наиболее значимые ассоциации с ХОБЛ были получены с локусом *MEG3* (rs7158663); маркерами риска заболевания являлись частый аллель А и генотип АА, носители редкого аллеля G чаще встречались среди здоровых индивидов. Локус *MEG3* (rs7158663) был идентифицирован как наиболее частый компонент ген–генных сочетаний, ассоциированных с развитием ХОБЛ, совместно с полиморфными локусами генов *PIK3R1*, *MTOR*, *SIRT6*, *SIRT3*. Ген *MEG3* (maternally expressed 3) локализован в области 14q32.2, регулирует митохондриальный путь апоптоза [22]. *MEG3* вовлечен в регуляцию TGF- $\beta$ /SMAD3-, Wnt-сигнальных каскадов, активности PI3K/AKT-пути [23]. Согласно данным функционального анализа, rs7158663 изменяет сайты связывания для нескольких транскрипционных факторов (PAX8, ATF6, PPAR $\gamma$ ) и мотивы для связывания с регуляторами транскрипции (ARNT2, FOXP3, BHLHE40, ELF5). Изменение уровня экспрессии, по данным портала GTEx, происходит в мононуклеарных клетках крови и эндотелии артерий. Согласно базе lncRNASNP2 database (<https://guolab.wchscu.cn/lncRNASNP/>), полиморфизм rs7158663 способен изменять структуру

сворачивания локальной РНК и влиять на взаимодействие с миРНК (miR-4307 и miR-1265) и днРНК, что, в свою очередь, влияет на уровень экспрессии соответствующей миРНК или *MEG3* [24]. В исследовании Gao et al. (2021) было показано, что уровень экспрессии *MEG3* в ткани толстого кишечника у носителей частого аллеля А значимо ниже, чем у гомозигот по редкому аллелю GG [24]. Установлена ассоциация генотипа АА и аллеля А локуса *MEG3* (rs7158663) с развитием сахарного диабета 2-го типа [21]. Показано, что *MEG3* участвует в регуляции воспалительного ответа посредством подавления miR-138, модулируя экспрессию молекул NF- $\kappa$ B-сигнального каскада и провоспалительных цитокинов [25]. *MEG3* связывает miR-181a-5p с последующей стимуляцией сигнального каскада PTEN/pSTAT5/SOCS1 в макрофагах [26], а ингибирование miR-133a-3p приводит к увеличению уровня экспрессии *SIRT1* и снижает степень легочного повреждения [27]. Одной из целевых молекул *MEG3* является miR-181b-3p, которая связана с патологическим ангиогенезом в легких и тем самым формирует основу для развития эмфиземы [28]. *MEG3* может снижать степень клеточного старения эпителиальных клеток легких через ингибирование miR-125a-5p [29]. *MEG3* выступает как ингибитор каскада miR-664a-3p/FHL1, связанного с окислительным стрессом, опосредованным воздействием сигаретного дыма [30].

Учитывая широкий спектр функций данной днРНК, вовлеченных в патогенез возраст-ассоциированных заболеваний (регуляция воспалительного каскада, окислительного стресса, апоптоза, PI3K/AKT-пути), пониженный уровень экспрессии *MEG3*, связанный с полиморфизмом rs7158663, является значимым фактором риска развития ХОБЛ.

Нами установлена ассоциация аллеля А локуса *CDKN2B-AS* (rs4977574) с развитием ХОБЛ, данный вариант также являлся составной частью рискованной ген–генной комбинации в сочетании с полиморфным вариантом гена *PIK3R1* (rs3730089). Аллель G локуса *CDKN2B-AS* (rs4977574) чаще встречался у здоровых индивидов и входил в информативную протективную ген–генную комбинацию в сочетании с аллелями генов *MEG3* (rs7158663), *MTOR* (rs2295080) и *SIRT6* (rs107251). ДнРНК *CDKN2B-AS* (CDKN2B antisense RNA) транскрибируется с антисмысловой цепью кластера генов *CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>*, *CDKN2A/p14<sup>ARF</sup>* и *CDKN2B/p15<sup>INK4B</sup>*, кодирующих ингибиторы циклин-зависимой киназы 4 (CDK4) и (*MTAP*) (methylthioadenosine phosphorylase) на хромосоме 9p21.3, которые играют ключевую роль в контроле клеточной пролиферации, апоптозе, клеточном старении [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100048912/>]. Молекулярные механизмы действия *CDKN2B-AS1* осуществляются посредством взаимодействия с белками поликомбового репрессивного комплекса 1 и 2

(PRC1 и PRC2), такой комплекс обладает способностью к эпигенетической цис-инактивации генов-мишеней кластера *CDKN2B-CDKN2A* [31]. Исследованный нами rs4977574 влияет на уровень экспрессии *CDKN2B-AS1*; так, по данным портала GTEx и базы HaploReg v3, изменения экспрессии выявлены в крови, rs4977574 изменяет мотивы для регуляторных белков. Наличие аллеля G в локусе rs4977574 *CDKN2B-AS1* приводит к усилению образования линейных изоформ молекулы *CDKN2B-AS1*, способных к связыванию с поликомбовыми белками, наряду со снижением экспрессии кольцевых транскриптов *CDKN2B-AS1* [32]. Результаты полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) показали значимую ассоциацию аллеля G локуса rs4977574 с развитием ишемической болезни сердца (ИБС) [33]. Необходимо отметить связь *CDKN2B-AS* с целым спектром возраст-ассоциированных заболеваний [34]. При ХОБЛ ассоциативных исследований полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS* не проводилось, однако пониженный уровень экспрессии циркулирующей *CDKN2B-AS* в плазме крови был связан с обострениями ХОБЛ [35].

Ген *LINC02227* (long intergenic non-protein coding RNA 2227 (minus strand)) локализован на хромосоме 5q33.3, rs2149954, был впервые идентифицирован в 2014 г. в результате полногеномных исследований как ассоциированный с долгожительством [36]. Аллель А rs2149954 был связан с низким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и артериальной гипертензии в среднем возрасте и возрасте достижения долголетия [36]. Функциональный анализ показал, что rs2149954 локализован в области сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I, участков связывания транскрипционных факторов и энхансеров гистоновых белков. Нами установлена ассоциация локуса *LINC02227* (rs2149954) с развитием ХОБЛ, при этом маркером риска является частый аллель G, тогда как аллель А и генотип АА маркируют устойчивость к развитию заболевания. Аллель G локуса *LINC02227* (rs2149954) был идентифицирован в информативной рискованной ген-генной комбинации с полиморфным вариантом гена *SIRT3* (rs536715), митохондриальной деацетилазой, играющей ключевую роль в регуляции процессов клеточного старения [37].

В результате полигенного анализа нами были получены информативные комбинации, ассоциированные с ХОБЛ, составными компонентами которых были полиморфные варианты генов днРНК *LINC00305* (rs2850711), *LINC00261* (rs6048205) и *MALAT1* (rs619586), не показавшие ассоциацию при базовом анализе отдельных SNP. Аллель А локуса *LINC00305* (rs2850711) был выявлен в двух наиболее значимых рискованных ген-генных комбинациях, связанных с ХОБЛ в сочетании с полиморфными

вариантами генов *PIK3R1*, *PTEN* и сиртуинов (*SIRT6* и *SIRT3*). *LINC00305* (long intergenic non-protein coding RNA 305) расположен в области 18q22.1, является регулятором NF- $\kappa$ B-сигнального каскада, усиливает экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины [38]. Аллель А локуса *LINC00261* (rs6048205) был выявлен в двух информативных ген-генных комбинациях, ассоциированных с пониженным риском развития ХОБЛ в сочетании с полиморфными локусами генов *SIRT3*, *PIK3R1* и гена *MALAT1*. Ранее было показано, что минорный аллель Т ассоциировал с развитием ревматоидного артрита, при этом у гомозигот по редкому аллелю ТТ и гетерозигот (АТ) по локусу rs2850711 уровень экспрессии *LINC00305* был значимо выше [39]. *LINC00261* (long intergenic non-protein coding RNA 261 (minus strand)) локализован на участке 20p11.21, rs6048205 был идентифицирован как ассоциированный с уровнем глюкозы при полногеномном исследовании [40]. По данным функционального анализа, rs6048205 находится в 5'-регионе гена и сцеплен с SNP в 3'-нетранслируемой области гена *FOX42* (forkhead box A2), являющегося регулятором транскрипции и фактором, связанным с регуляцией гомеостаза глюкозы [41]. Rs6048205 изменяет сайты связывания с регуляторными белками (FOXA1, SP1, CEBPB, P300, TCF4), транскрипционными факторами; согласно portalу GTEx, аллель А связан с повышенной экспрессией гена. *LINC00261* участвует в регуляции апоптоза и клеточного гомеостаза, функционируя как отрицательный регулятор Notch- и NF- $\kappa$ B-сигнального каскада, модулирует функцию SMAD3 — ключевого компонента TGF- $\beta$ 1-сигнального пути, подавляя ЭМП [42].

*MALAT1* (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) расположен в области 11q13.1, является регулятором экспрессии IL6 и TNF- $\alpha$  [43]. *MALAT1* активно экспрессируется в большинстве тканей организма человека, однако повышенная экспрессия *MALAT1* часто выявляется в различных типах злокачественных новообразований и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и риском метастазирования [44]. Rs619586 локализован в участке связывания с ДНКазой I, с регуляторными белками, транскрипционными факторами и гистоновыми метками. По данным portalа GTEx, изменение экспрессии подтверждено в 14 типах тканей, в том числе крови, артериях и скелетной мускулатуре, при этом аллель G приводит к увеличению уровня экспрессии *MALAT1*. Нами показано, что аллель А *MALAT1* (rs619586) входил в две протективные комбинации, ассоциированные с ХОБЛ, тогда как аллель G, связанный с повышенным уровнем экспрессии *MALAT1*, входил в ген-генное сочетание повышенного риска развития ХОБЛ. Установлено, что уровень экспрессии *MALAT1* положительно коррелирует с тяжестью

заболевания и уровнем провоспалительных цитокинов у больных ХОБЛ, взаимодействует с miR-125b, miR-146a, miR-203, приводя к усилению воспаления, функционируя как регулятор MAPK/NF- $\kappa$ B-сигналинга [45].

В результате проведенного исследования впервые в нашей работе показаны значимая ассоциация полиморфных локусов генов днРНК *H19*, *MEG3*, *CDKN2B-AS* и *LINC02227* с ХОБЛ и наличие межгенных взаимодействий генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и НАД-зависимых деацетилаз семейства сиртуинов и исследованных днРНК (*MEG3*, *CDKN2B-AS*, *MALAT1*, *LINC00261*, *LINC00305*). Полученные нами данные указывают на то, что молекулярный патогенез ХОБЛ может включать механизмы, связанные с нарушением регуляции стрессовых реакций, препятствующих клеточному старению, при которых ключевую роль играет сеть длинных некодирующих РНК. Связанные с апоптозом, клеточным гомеостазом, окислительным стрессом и клеточным старением некодирующие РНК как потенциальные биомаркеры и мишени для терапии могут стать основой для разработки новой стратегии диагностики и лечения ХОБЛ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00019, <https://rscf.ru/project/23-25-00019/>, с использованием оборудования ЦКП "Биомика" и УНУ "КОДИНК" (ИБГ УФИЦ РАН).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года 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. Agustí A., Celli B.R., Criner G.J. et al. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: GOLD executive summary // Eur. Respir. J. 2023. V. 61. № 4. P. 2300239. doi: 10.1183/13993003.00239-2023
2. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р. и др. Хроническая обструктивная болезнь легких: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению // Пульмонология. 2022. Т. 32. № 3. С. 356–392. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2022-32-3-356-392>
3. Agustí A., Melén E., DeMeo D.L. et al. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: Understanding the contributions of gene-environment interactions across the lifespan // Lancet Respir. Med. 2022. V. 10. № 5. P. 512–524. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00555-5
4. Brandsma C.A., Van den Berge M., Hackett T.L. et al. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: From disease mechanisms to precision medicine // J. Pathol. 2020. V. 250. № 5. P. 624–635. doi: 10.1002/path.5364
5. Bridges M.C., Daulagala A.C., Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function // J. Cell Biol. 2021. V. 220. № 2. doi: 10.1083/jcb.202009045
6. Devadoss D., Long C., Langley R.J. et al. Long non-coding transcriptome in chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2019. V. 61. № 6. P. 678–688. doi: 10.1165/rcmb.2019-0184TR
7. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № D1. P. D877–881. doi: 10.1093/nar/gkv1340
8. Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Aznabaeva Y.G. et al. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease // Gene. 2019. V. 692. P. 102–112. doi: 10.1016/j.gene.2018.12.061
9. González J.R., Armengol L., Solé X. et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies // Bioinformatics. 2007. V. 23. № 5. P. 644–645. doi: 10.1093/bioinformatics/btm025
10. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // Genetics. 2005. V. 171. № 4. P. 2113–2121. doi: 10.1534/genetics.105.048090
11. Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Markelov V.A. et al. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and sirtuin genes in chronic obstructive pulmonary disease development // Vavil. Zh. Genet. Selektsii. 2023. V. 27. № 5. P. 512–521. doi: 10.18699/VJGB-23-62
12. Song Y., Xing H., Zhou L. et al. LncRNA H19 modulated by miR-146b-3p/miR-1539-mediated allelic regulation in transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma // Arch. Toxicol. 2021. V. 95. № 9. P. 3063–3070. doi: 10.1007/s00204-021-03119-8
13. Lu Q., Guo Z., Xie W. et al. The lncRNA H19 mediates pulmonary fibrosis by regulating the miR-196a/COL1A1 Axis // Inflammation. 2018. V. 41. № 3. P. 896–903. doi: 10.1007/s10753-018-0744-4

14. Xu J.L., Hua T., Ding J. *et al.* FOXF2 aggravates the progression of non-small cell lung cancer through targeting lncRNA H19 to downregulate PTEN // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2019. V. 23. № 24. P. 10796–10802.  
doi: 10.26355/eurev\_201912\_19782
15. Wang R., Zhou S., Wu P. *et al.* Identifying involvement of H19-miR-675-3p-IGF1R and H19-miR-200a-PDCD4 in treating pulmonary hypertension with melatonin // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2018. V. 13. P. 44–54.  
doi: 10.1016/j.omtn.2018.08.015
16. Zhang R., Pan T., Xiang Y. *et al.* Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis // *Bioact. Mater.* 2021. V. 13. P. 23–36.  
doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.013
17. Yu H., Qi N., Zhou Q. LncRNA H19 inhibits proliferation and migration of airway smooth muscle cells induced by PDGF-BB through miR-21/PTEN/Akt axis // *J. Asthma Allergy.* 2021. V. 14. P. 71–80.  
doi: 10.2147/JAA.S291333
18. Bu N., Gao Y., Zhao Y. *et al.* LncRNA H19 via miR-29a-3p is involved in lung inflammation and pulmonary fibrosis induced by neodymium oxide // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 247.  
doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114173
19. Liao J., Chen B., Zhu Z. *et al.* Long noncoding RNA (lncRNA) H19: An essential developmental regulator with expanding roles in cancer, stem cell differentiation, and metabolic diseases // *Genes Dis.* 2023. V. 10. № 4. P. 1351–1366.  
doi: 10.1016/j.gendis.2023.02.008
20. Li L., Huang Q., Yan F. *et al.* Association between long non-coding RNA H19 polymorphisms and breast cancer risk: A meta-analysis // *Women Health.* 2022. V. 62. № 6. P. 565–575.  
doi: 10.1080/03630242.2022.2096748
21. Ghaedi H., Zare A., Omrani M.D. *et al.* Genetic variants in long noncoding RNA H19 and MEG3 confer risk of type 2 diabetes in an Iranian population // *Gene.* 2018. V. 675. P. 265–271.  
doi: 10.1016/j.gene.2018.07.002
22. Al-Rugeebah A., Alanazi M., Parine N.R. MEG3: An oncogenic long non-coding RNA in different cancers // *Pathol. Oncol. Res.* 2019. V. 25. № 3. P. 859–874.  
doi: 10.1007/s12253-019-00614-3
23. Gokey J.J., Snowball J., Sridharan A. *et al.* MEG3 is increased in idiopathic pulmonary fibrosis and regulates epithelial cell differentiation // *JCI Insight.* 2018. V. 3. № 17.  
doi: 10.1172/jci.insight.122490
24. Gao X., Li X., Zhang S. *et al.* The association of MEG3 gene rs7158663 polymorphism with cancer susceptibility // *Front. Oncol.* 2021. V. 11.  
doi: 10.3389/fonc.2021.796774
25. Li R., Fang L., Pu Q. *et al.* MEG3-4 is a miRNA decoy that regulates IL-1 $\beta$  abundance to initiate and then limit inflammation to prevent sepsis during lung infection // *Sci. Signal.* 2018. V. 11. № 536.  
doi: 10.1126/scisignal.aao2387
26. Su Y., Silva J.D., Doherty D. *et al.* Mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles reprogramme macrophages in ARDS models through the miR-181a-5p-PTEN-pSTAT5-SOCS1 axis // *Thorax.* 2023. V. 78. № 6. P. 617–630.  
doi: 10.1136/thoraxjnl-2021-218194
27. Chen L., Xie W., Wang L. *et al.* MiRNA-133a aggravates inflammatory responses in sepsis by targeting SIRT1 // *Int. Immunopharmacol.* 2020. V. 88.  
doi: 10.1016/j.intimp.2020.106848
28. Green C.E., Clarke J., Bicknell R. *et al.* Pulmonary microRNA changes alter angiogenesis in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 7.  
doi: 10.3390/biomedicines9070830
29. Wu H., Ma H., Wang L. *et al.* Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1 $\alpha$  // *Int. J. Biol. Sci.* 2022. V. 18. № 2. P. 661–674.  
doi: 10.7150/ijbs.65861
30. Zhong S., Chen C., Liu N. *et al.* Overexpression of hsa-miR-664a-3p Is associated with cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease via targeting FHL1 // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2019. V. 14. P. 2319–2329.  
doi: 10.2147/COPD.S224763
31. Guil S., Soler M., Portela A. *et al.* Intronic RNAs mediate EZH2 regulation of epigenetic targets // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 7. P. 664–670.  
doi: 10.1038/nsmb.2315
32. Holdt L.M., Teupser D. Long noncoding RNA ANRIL: Lnc-ing genetic variation at the chromosome 9p21 locus to molecular mechanisms of atherosclerosis // *Front. Cardiovasc. Med.* 2018. V. 5.  
doi: 10.3389/fcvm.2018.00145
33. Van der Harst P., Verweij N. Identification of 64 novel genetic loci provides an expanded view on the genetic architecture of coronary artery disease // *Circ. Res.* 2018. V. 122. № 3. P. 433–443.  
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312086
34. Cunnington M.S., Santibanez Koref M., Mayosi B.M. *et al.* Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 4.  
doi: 10.1371/journal.pgen.1000899
35. Ge J., Geng S., Jiang H. Long noncoding RNAs antisense noncoding RNA in the INK4 locus (ANRIL) correlates with lower acute exacerbation risk, decreased inflammatory cytokines, and mild GOLD stage in patients with chronic obstructive pulmonary

- disease // *J. Clin. Lab. Anal.* 2019. V. 33. № 2.  
doi: 10.1002/jcla.22678
36. *Deelen J., Beekman M., Uh H.W. et al.* Genome-wide association meta-analysis of human longevity identifies a novel locus conferring survival beyond 90 years of age // *Hum. Mol. Genet.*, 2014. V. 23. № 16. P. 4420–4432.  
doi: 10.1093/hmg/ddu139
  37. *Sun W., Liu C., Chen Q. et al.* SIRT3: A new regulator of cardiovascular diseases // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018. V. 2018.  
doi: 10.1155/2018/7293861
  38. *Zhang D.D., Wang W.T., Xiong J. et al.* Long noncoding RNA LINC00305 promotes inflammation by activating the AHRN-NF- $\kappa$ B pathway in human monocytes // *Sci. Rep.* 2017. V. 7.  
doi: 10.1038/srep46204
  39. *Wahba A.S., Ibrahim M.E., Mesbah N.M. et al.* Serum LINC00305 expression and its genetic variant rs2850711 are associated with clinical and laboratory features of rheumatoid arthritis // *Br. J. Biomed. Sci.* 2020. V. 77. № 3. P. 142–147.  
doi: 10.1080/09674845.2020.1744942
  40. *Manning A.K., Hivert M.F., Scott R.A. et al.* A genome-wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. № 6. P. 659–669.  
doi: 10.1038/ng.2274
  41. *Johnson M.E., Schug J., Wells A.D. et al.* Genome-wide analyses of ChIP-Seq derived FOXA2 DNA occupancy in liver points to genetic networks underpinning multiple complex traits // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. V. 99. № 8. P.E1580-5.  
doi: 10.1210/jc.2013-4503
  42. *Chen Z., Xiang L., Li L. et al.* TGF- $\beta$ 1 induced deficiency of linc00261 promotes epithelial-mesenchymal-transition and stemness of hepatocellular carcinoma via modulating SMAD3 // *J. Transl. Med.* 2022. V. 20. № 1. P.75.  
doi: 10.1186/s12967-022-03276-z
  43. *Zhu R., Liu X., He Z.* Long non-coding RNA H19 and MALAT1 gene variants in patients with ischemic stroke in a northern Chinese Han population // *Mol. Brain.* 2018. V. 11. № 1. P. 58.  
doi: 10.1186/s13041-018-0402-7
  44. *Chen M., Cai D., Gu H. et al.* MALAT1 rs619586A/G polymorphisms are associated with decreased risk of lung cancer // *Medicine (Baltimore)*. 2021. V. 100. № 12.  
doi: 10.1097/MD.00000000000023716
  45. *Wu W., Wang S., Zhang L. et al.* Mechanistic studies of MALAT1 in respiratory diseases // *Front. Mol. Biosci.* 2022. V. 9.  
doi: 10.3389/fmolb.2022.1031861

# Association of Long Non-Coding RNA Genes (*H19*, *MEG3*, *MALAT1*, *LINC00305*, *LINC00261*, *LINC02227*, and *CDKN2B-AS1*) Polymorphic Loci with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

G. F. Korytina<sup>1, 2\*</sup>, L. Z. Akhmadishina<sup>1, 3</sup>, V. A. Markelov<sup>1, 2</sup>, T. R. Nasibullin<sup>1</sup>,  
Y. G. Aznabaeva<sup>2</sup>, O. V. Kochetova<sup>1</sup>, N. N. Khusnutdinova<sup>1</sup>, A. P. Larkina<sup>1</sup>,  
N. Sh. Zagidullin<sup>2</sup>, T. V. Victorova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

<sup>2</sup>*Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia*

<sup>3</sup>*Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, 450064 Russia*

\*e-mail: guly\_kory@mail.ru

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic lung disease resulting from dynamic, cumulative gene-environment interactions that cause lung tissue injury, alteration of its normal function and acceleration of cellular senescence. Long non-coding RNAs (lncRNAs) function as critical epigenetic regulators of various aspects of cellular senescence. The objective of the present study is to identify the association between polymorphic variants of *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *MALAT1* (rs619586), *LINC00305* (rs2850711), *LINC00261* (rs6048205), *CDKN2B-AS1* (rs4977574), and *LINC02227* (rs2149954) lncRNAs genes with COPD. DNA samples from COPD patients ( $N = 703$ ) and healthy individuals ( $N = 655$ ) were studied in this study and polymorphic loci were analyzed by real-time PCR. Association with COPD was established with *H19* (rs3741219), *MEG3* (rs7158663), *LINC02227* (rs2149954), *MALAT1* (rs619586) and *CDKN2B-AS1* (rs4977574). Polygenic analysis has allowed to identify informative gene-gene combinations that include polymorphic variants of the studied lncRNAs genes and genes encoding molecules of signaling cascades associated with cellular senescence and apoptosis. Multiple regression and ROC-analysis revealed a COPD risk predictive model, which included gene-gene combinations of lncRNAs genes and smoking index ( $P = 4.01 \times 10^{-48}$ , AUC = 0.87).

**Keywords:** Chronic obstructive pulmonary disease, long non-coding RNAs, cellular senescence, polygenic analysis, *H19*, *MEG3*, *LINC02227*, *CDKN2B-AS1*.

УДК 575.174

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ НАСЕЛЕНИЯ КУРСКОЙ И ВОРОНЕЖСКОЙ ГУБЕРНИЙ В ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЕ XX ВЕКА. ИЗОЛЯЦИЯ РАССТОЯНИЕМ МАЛЕКО

© 2024 г. К. Н. Сергеева<sup>1</sup>, С. Н. Сокорев<sup>1</sup>, Ю. И. Гончарова<sup>1</sup>,  
А. С. Невинных<sup>1</sup>, И. В. Батлуккая<sup>1</sup>, И. Н. Сорокина<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

\*e-mail: Sorokina\_5@mail.ru

Поступила в редакцию 25.02.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

В статье представлены результаты оценки изменчивости показателей модели изоляции расстоянием Малеко среди населения Курской и Воронежской губерний с 1890–1910 гг. по 1951–1953 гг. За 60 лет произошло увеличение уровня локального инбридинга (2.8 раза), среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (3.7 раза) и без них (5.44 раза) и снижение эффективного размера популяции (2.8 раза), коэффициента линейного систематического давления (4.5 раза).

**Ключевые слова:** модель изоляции расстоянием Малеко, локальный инбридинг.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090105 **EDN:** ADLEAT

При описании популяционной структуры населения и ее динамики важное значение имеет количественная оценка брачно-миграционных параметров, в качестве которых могут выступать показатели модели изоляции расстоянием Малеко [1–3]. Данная модель изоляции расстоянием широко используется в популяционно-генетических исследованиях и позволяет устанавливать зависимость степени кровного родства супругов от расстояния между местами их рождения. Преимуществом данного подхода является возможность проводить оценку как меж-, так и внутривнутрипопуляционного родства [3]. Следует отметить, что значения локального инбридинга ( $a$ ), полученные с помощью данной модели, соответствуют показателю подразделенности популяции ( $F_{st}$  Райта), рассчитанному по фамилиям [3–6].

С использованием модели изоляции расстоянием Малеко изучено население как различных зарубежных популяций (Бара, Австралии, Швейцарии, Исландии и др.) [2, 7–11], так и популяций на территории России (Костромская, Кировская, Архангельская, Тверская, Курская области, Краснодарский край, Республика Адыгея, Республика Марий Эл, Удмуртия, Татарстан и др.) [5, 6, 12–27] и бывшего СНГ (Украина и др.) [28–30].

Настоящее сообщение продолжает серию работ [31], посвященных изучению динамики ряда популяционно-демографических показателей среди населения юга Центральной России, и представляет результаты изучения параметров модели

изоляции расстоянием среди населения Курской и Воронежской губерний, из которых в 1954 г. была сформирована Белгородская область, в динамике за 60-летний период (с 1890-х гг. по 1951–1953 гг.).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект настоящего исследования — население Центрального Черноземья (Курской и Воронежской губерний) конца XIX в. — середины XX в. Детальные характеристики изучаемых уездов (в последующем районов) и критерии их включения изложены в ранее представленной работе [31]. Исследование проводилось за два временных периода: 1890–1910 гг. и 1951–1953 гг. — до момента образования Белгородской области в 1954 г. из части уездов Курской и Воронежской губерний. В работу были включены Белгородский, Грайворонский, Корочанский, Новооскольский, Старооскольский уезды (районы), которые входили в состав Курской губернии, затем Курской области, а после 1954 г. отошли к Белгородской области. Другие уезды (районы) — Бирючанский (позже Красногвардейский и частично Алексеевский) и Валуйский до 1954 г. входили в состав Воронежской губернии, затем Воронежской области, после 1954 г. являются районами Белгородской области. Материалом для исследования послужили данные записей церковно-приходских книг Архива ЗАГС Белгородской области конца XIX в. (1890–1910 гг. — 4925 записей), а также актов гражданского состояния

областного архива ЗАГС за 1951–1953 гг. (5128 записей). Из актовых записей выкопировалась информация о местах рождения женихов и невест. Далее проводилось измерение расстояний между местами рождения супругов по прямой в километрах с использованием интернет-ресурса <https://ru.distance.to/Just...> Всего в анализ было включено 10053 расстояния между местами рождения супругов. Расчеты параметров изоляции расстоянием Малекко проводились в соответствии с работами G. Malecot [1], N.E. Morton [2], Г.И. Ельчиновой и др. [3, 4, 25]. Анализ параметров модели Малекко проводился на уровне уездов (районов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Параметры модели изоляции расстоянием Малекко среди населения Курской и Воронежской губерний*

**1890–1910 гг.** Изучение показателей модели изоляции расстоянием Малекко в уездах Курской и Воронежской губерний в 1890–1910 гг. показало значительную вариабельность таких показателей, как среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (2.6 раза: от 21.75 км до 55.84 км) и без них (2.6 раз: от 8.65 км до 22.62 км), коэффициент линейного систематического давления (2.2 раза: от 0.01942 до 0.04168) (табл. 1).

В целом в Воронежской губернии были выше, чем в Курской губернии, среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (в 1.4 раза) и без них (в 1.6 раза), эффективное давление миграций (в 1.2 раза). При этом средние значения коэффициента линейного систематического давления (в 1.5 раза) и локального инбридинга (в 1.4 раза) в Воронежской губернии ниже, чем в Курской губернии, в связи с тем, что эффективный размер популяции в Воронежской губернии превышал в 1.2 раза эффективный размер популяции Курской губернии (табл. 1).

Среди городского населения по сравнению с сельским выше значения локального инбридинга (в 19.5 раз), среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (в 1.9 раза) и без них (в 2.7 раза), а эффективный размер популяции и коэффициент линейного систематического давления ниже в 13.8 раз и 2 раза соответственно. Также городские популяции характеризовались более высокой вариабельностью большинства рассчитываемых показателей. Следует отметить, что сельское население всех семи уездов испытывало одинаково низкую (0.00006–0.00014) инбредную нагрузку.

**1951–1953 гг.** В 1951–1953 гг. среди населения Курской и Воронежской областей максимальная

изменчивость отмечалась для коэффициента линейного систематического давления (4 раза, при вариабельности от 0.00291 до 0.01154), среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (2 раза, при вариабельности от 93 км до 185.02 км) и без них (3.6 раза, при вариабельности от 36.78 км до 133.25 км), эффективного размера популяции (2.7 раза, при вариабельности от 13359 до 36485) и локального инбридинга (2.2 раза, при вариабельности от 0.00010 до 0.00022) (табл. 2).

В 1951–1953 гг. районы Курской и Воронежской областей испытывали одинаково низкую инбредную нагрузку при незначительных различиях в значениях среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций и без них (выше в Воронежской области — в 1.3, 1.6 раза соответственно), коэффициента линейного систематического давления и эффективного размера популяции (несколько выше в Курской области — в 1.9 и 1.2 раза соответственно) (табл. 2).

Среди городского населения эффективный размер популяции был меньше (в 1.6 раза), а уровень локального инбридинга существенно выше (в 4.2 раза) по сравнению с сельским населением. Также городские популяции отличались более высокой вариабельностью ряда показателей (локальный инбридинг — 18.5 раз, эффективный размер популяции — 18.4 раза, коэффициент линейного систематического давления миграций — 5.2 раза, среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов без учета дальних миграций — 4.6 раза) по сравнению с сельскими (табл. 2). Следует отметить, что сельское население всех семи районов испытывало одинаково низкую (0.00016–0.00033) инбредную нагрузку, которая увеличилась в 3.4 раза за последние 60 лет (с 1890–1910 гг. к 1951–1953 гг.).

Таким образом, с конца XIX в. к середине XX в. увеличились среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций и без них (в 3.7 раза и 5.4 раза соответственно), значения локального инбридинга (в 2.8 раза) при уменьшении эффективного размера популяции (в 2.9 раз) и коэффициента линейного систематического давления миграций (в 4.5 раза).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ параметров модели изоляции расстоянием Малекко среди населения Центрального Черноземья с 1890–1910 гг. по 1951–1953 гг. показал увеличение уровня локального инбридинга (в 2.8 раза) на фоне уменьшения эффективного размера популяции (почти в 3 раза). Следует отметить, что период 1890–1910 гг. характеризовался высокими значениями эффективного размера популяции и

Таблица 1. Параметры модели изоляции расстоянием Малеко среди населения Курской и Воронежской губерний в 1890—1910 гг.

|                               | Уезд                  | <i>N</i> | $\sigma$ | $\sigma'$ | <i>m</i> | <i>k</i> | <i>M<sub>e</sub></i> | <i>N<sub>e</sub></i> | <i>a</i> | <i>b</i> |
|-------------------------------|-----------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------------------|----------------------|----------|----------|
| Уезды<br>Курской губернии     | Белгородский          | 844      | 36.17    | 13.21     | 0.011    | 0.222    | 0.070                | 58100                | 0.00006  | 0.02823  |
|                               | город                 | 253      | 53.95    | 18.26     | 0.020    | 0.130    | 0.074                | 8855                 | 0.00038  | 0.02114  |
|                               | село                  | 591      | 24.95    | 7.52      | 0.011    | 0.253    | 0.075                | 49245                | 0.00007  | 0.05164  |
|                               | Старооскольский       | 795      | 40.94    | 12.78     | 0.013    | 0.235    | 0.078                | 48670                | 0.00007  | 0.03087  |
|                               | город                 | 167      | 68.88    | 29.49     | 0.021    | 0.165    | 0.086                | 5206                 | 0.00056  | 0.01404  |
|                               | село                  | 628      | 29.33    | 10.18     | 0.008    | 0.243    | 0.063                | 43464                | 0.00009  | 0.03478  |
|                               | Новооскольский        | 727      | 24.92    | 8.65      | 0.010    | 0.152    | 0.057                | 52616                | 0.00008  | 0.03900  |
|                               | город                 | 302      | 32.40    | 13.45     | 0.013    | 0.094    | 0.052                | 999                  | 0.00482  | 0.02391  |
|                               | село                  | 425      | 20.61    | 5.28      | 0.006    | 0.195    | 0.048                | 51618                | 0.00010  | 0.05889  |
|                               | Корочанский           | 364      | 44.47    | 14.73     | 0.012    | 0.173    | 0.067                | 53008                | 0.00007  | 0.02478  |
| Уезды<br>Воронежской губернии | город                 | 162      | 64.57    | 21.39     | 0.025    | 0.086    | 0.070                | 3412                 | 0.00105  | 0.01747  |
|                               | село                  | 202      | 14.83    | 4.88      | 0.002    | 0.265    | 0.036                | 49596                | 0.00014  | 0.05521  |
|                               | Грайворонский         | 789      | 21.75    | 8.98      | 0.013    | 0.187    | 0.070                | 59160                | 0.00006  | 0.04168  |
|                               | город                 | 321      | 20.59    | 9.16      | 0.008    | 0.181    | 0.054                | 2113                 | 0.00220  | 0.03573  |
|                               | село                  | 469      | 22.48    | 8.84      | 0.016    | 0.191    | 0.080                | 57046                | 0.00006  | 0.04520  |
|                               | В среднем по губернии | 704      | 33.65    | 11.67     | 0.012    | 0.194    | 0.068                | 54311                | 0.00007  | 0.03291  |
|                               | город                 | 241      | 48.08    | 18.35     | 0.017    | 0.131    | 0.067                | 4117                 | 0.00180  | 0.02246  |
|                               | село                  | 463      | 22.44    | 7.34      | 0.009    | 0.229    | 0.060                | 50194                | 0.00009  | 0.04915  |
|                               | Валуйский             | 820      | 55.84    | 22.62     | 0.020    | 0.221    | 0.097                | 62704                | 0.00004  | 0.01942  |
|                               | город                 | 190      | 102.66   | 72.38     | 0.021    | 0.184    | 0.091                | 2233                 | 0.00124  | 0.00588  |
| Уезды<br>Воронежской губернии | село                  | 630      | 40.11    | 14.91     | 0.010    | 0.224    | 0.066                | 60472                | 0.00006  | 0.02436  |
|                               | Бирючанский           | 586      | 37.68    | 14.34     | 0.009    | 0.258    | 0.070                | 66889                | 0.00005  | 0.02612  |
|                               | город                 | 259      | 32.36    | 12.22     | 0.012    | 0.28     | 0.081                | 4360                 | 0.00070  | 0.03302  |
|                               | село                  | 327      | 41.41    | 14.72     | 0.009    | 0.252    | 0.069                | 62529                | 0.00006  | 0.02517  |
|                               | В среднем по губернии | 703      | 46.76    | 18.48     | 0.015    | 0.240    | 0.083                | 64797                | 0.00005  | 0.02277  |
|                               | город                 | 225      | 67.51    | 42.30     | 0.016    | 0.232    | 0.086                | 3297                 | 0.00097  | 0.01945  |
|                               | село                  | 479      | 40.76    | 14.82     | 0.009    | 0.238    | 0.067                | 61501                | 0.00006  | 0.02477  |
|                               | В среднем по региону  | 704      | 37.40    | 13.62     | 0.013    | 0.207    | 0.073                | 57307                | 0.00006  | 0.03001  |
|                               | город                 | 236      | 53.63    | 25.19     | 0.017    | 0.160    | 0.072                | 3883                 | 0.00156  | 0.02160  |
|                               | село                  | 467      | 27.67    | 9.48      | 0.009    | 0.232    | 0.062                | 53424                | 0.00008  | 0.04218  |

Примечание для табл. 1, 2.  $\sigma$  — среднеквадратическое расстояние между местами рождения супругов с учетом дальних миграций;  $\sigma'$  — среднеквадратическое расстояние между местами рождения супругов без учета дальних миграций; *m* — половина доли дальних миграций; *k* — половина доли промежуточных миграций; *M<sub>e</sub>* — эффективное давление миграций; *N<sub>e</sub>* — эффективный размер популяции; *a* — локальный инбридинг; *b* — коэффициент линейного систематического давления.

Таблица 2. Параметры модели изоляции расстоянием Малёко среди населения Курской и Воронежской областей в 1951 – 1953 гг.

|                            | Район                | <i>N</i>   | $\sigma$      | $\sigma'$     | <i>m</i>     | <i>k</i>     | <i>M<sub>c</sub></i> | <i>N<sub>c</sub></i> | <i>a</i>       | <i>b</i>       |
|----------------------------|----------------------|------------|---------------|---------------|--------------|--------------|----------------------|----------------------|----------------|----------------|
| Районы Курской области     | Белгородский         | 1170       | 123.40        | 52.97         | 0.019        | 0.113        | 0.068                | 36485                | 0.00010        | 0.00695        |
|                            | город                | 404        | 159.44        | 76.08         | 0.026        | 0.062        | 0.062                | 24093                | 0.00017        | 0.00464        |
|                            | село                 | 766        | 99.26         | 47.40         | 0.012        | 0.142        | 0.061                | 12393                | 0.00033        | 0.00735        |
|                            | Старооскольский      | 675        | 93.00         | 36.85         | 0.018        | 0.083        | 0.057                | 22730                | 0.00019        | 0.00917        |
|                            | город                | 197        | 103.14        | 34.32         | 0.018        | 0.048        | 0.045                | 9158                 | 0.00061        | 0.00875        |
|                            | село                 | 478        | 88.49         | 37.85         | 0.018        | 0.097        | 0.061                | 13572                | 0.00030        | 0.00926        |
|                            | Новооскольский       | 645        | 185.02        | 133.25        | 0.016        | 0.165        | 0.075                | 14889                | 0.00022        | 0.00291        |
|                            | город                | 102        | 167.66        | 76.10         | 0.025        | 0.093        | 0.072                | 4303                 | 0.00081        | 0.00498        |
|                            | село                 | 543        | 188.11        | 141.44        | 0.015        | 0.174        | 0.073                | 10586                | 0.00032        | 0.00270        |
|                            | Корочанский          | 633        | 144.91        | 54.27         | 0.021        | 0.212        | 0.097                | 16837                | 0.00015        | 0.00813        |
|                            | город                | 156        | 190.22        | 31.05         | 0.038        | 0.071        | 0.083                | 1309                 | 0.00229        | 0.01313        |
|                            | село                 | 477        | 126.61        | 52.21         | 0.019        | 0.257        | 0.100                | 15528                | 0.00016        | 0.00858        |
|                            | Грайворонский        | 643        | 95.65         | 36.78         | 0.023        | 0.169        | 0.090                | 13359                | 0.00021        | 0.01154        |
|                            | город                | 112        | 149.18        | 120.70        | 0.009        | 0.116        | 0.046                | 1714                 | 0.00314        | 0.00252        |
|                            | село                 | 551        | 78.44         | 28.22         | 0.017        | 0.180        | 0.081                | 11645                | 0.00027        | 0.01422        |
| Районы Воронежской области | В среднем по области | 753        | <b>128.40</b> | <b>62.83</b>  | <b>0.019</b> | <b>0.148</b> | <b>0.078</b>         | <b>20860</b>         | <b>0.00018</b> | <b>0.00774</b> |
|                            | город                | <b>194</b> | <b>153.93</b> | <b>67.65</b>  | <b>0.023</b> | <b>0.078</b> | <b>0.062</b>         | <b>8115</b>          | <b>0.00140</b> | <b>0.00680</b> |
|                            | село                 | <b>563</b> | <b>116.18</b> | <b>61.42</b>  | <b>0.016</b> | <b>0.170</b> | <b>0.075</b>         | <b>12745</b>         | <b>0.00028</b> | <b>0.00842</b> |
|                            | Валуйский            | 724        | 148.81        | 87.40         | 0.019        | 0.157        | 0.080                | 17228                | 0.00018        | 0.00458        |
|                            | город                | 193        | 117.88        | 45.16         | 0.026        | 0.098        | 0.076                | 6023                 | 0.00055        | 0.00863        |
|                            | село                 | 531        | 158.57        | 98.56         | 0.018        | 0.186        | 0.084                | 11206                | 0.00027        | 0.00415        |
|                            | Алексеевский         | 638        | 184.54        | 117.25        | 0.021        | 0.170        | 0.087                | 19004                | 0.00015        | 0.00357        |
|                            | город                | 295        | 209.77        | 141.27        | 0.020        | 0.217        | 0.096                | 6716                 | 0.00039        | 0.00310        |
|                            | село                 | 343        | 159.68        | 70.22         | 0.032        | 0.128        | 0.096                | 12288                | 0.00021        | 0.00625        |
|                            | В среднем по области | 681        | 166.67        | <b>102.33</b> | <b>0.020</b> | <b>0.163</b> | <b>0.084</b>         | <b>18116</b>         | <b>0.00017</b> | <b>0.00407</b> |
|                            | город                | <b>244</b> | <b>163.82</b> | <b>93.21</b>  | <b>0.023</b> | <b>0.158</b> | <b>0.086</b>         | <b>6370</b>          | <b>0.00047</b> | <b>0.00587</b> |
|                            | село                 | <b>437</b> | <b>159.12</b> | <b>84.39</b>  | <b>0.025</b> | <b>0.157</b> | <b>0.090</b>         | <b>11747</b>         | <b>0.00024</b> | <b>0.00520</b> |
|                            | В среднем по региону | 733        | 139.33        | 74.11         | 0.020        | 0.153        | 0.079                | 20076                | 0.00017        | 0.00669        |
|                            | город                | 208        | 156.75        | 74.95         | 0.023        | 0.101        | 0.069                | 7617                 | 0.00113        | 0.00654        |
|                            | село                 | 527        | 128.45        | 67.98         | 0.019        | 0.166        | 0.079                | 12460                | 0.00027        | 0.00750        |

минимальным уровнем локального инбридинга, что, в свою очередь, определялось большой численностью населения уездов Курской и Воронежской губерний, из которых в последующем образуется Белгородская область. Уезды представляли собой очень крупные административно-территориальные единицы. Так, например, на территории бывшего Грайворонского уезда в настоящее время располагаются пять районов [32]. Последующее резкое снижение эффективной численности населения Белгородского региона к периоду 1951–1953 гг. являлось следствием трех катастрофических, с точки зрения демографии, кризисов: 1) Первая мировая война, Гражданская война, голод 1915–1922 гг.; 2) коллективизация, голод 1930–1936 гг.; 3) Великая Отечественная война, голод – 1941–1945 гг. Так, например, по оценке Н.В. Чугуновой в 30-е гг. XX в. численность жителей Белгородской области в ее современных границах сократилась с 1.8 до 1.4 млн человек, или почти на 25% (за 1930–1939 гг.) [33]. Демографические потери Белгородчины от голода 1932–1933 гг. были сопоставимы с потерями мирного населения региона от оккупации войсками Германии и ее союзников в 1941–1943 гг. [34]. Белгородская земля стала ареной суровых боев в годы Великой Отечественной войны. Так, в ходе Курской битвы и Прохоровского танкового сражения г. Белгород был почти полностью разрушен, а из 34 тыс. жителей ко дню освобождения осталось лишь 150 человек. Аналогичная ситуация наблюдалась по другим населенным пунктам Белгородского региона.

Следует отметить, что с конца XIX в. к середине XX в. значительно расширился круг брачных миграций [31], о чем свидетельствует и увеличение среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций и без них. При этом эффективное давление миграций за 60-летний период не изменилось. Это объясняется теми административно-территориальными преобразованиями уездов и губерний, в результате которых оформились границы современных районов Белгородской области, и это сопровождалось значительным уменьшением эффективного размера популяции.

Стоит отметить, что за 60-летний период изменчивость основных параметров изоляции расстоянием Малекко среди городского и сельского населения несколько отличалась. С конца XIX в. до середины XXI в. эффективный размер популяции среди городского населения увеличился в 2 раза, а уровень локального инбридинга уменьшился в 1.4 раза по сравнению с сельским населением. Среди сельского населения наблюдалось уменьшение как эффективного размера в 4.3 раза, так и уровня локального инбридинга в 3.4 раза.

Связь параметров изоляции популяций (локального инбридинга, миграций и др.) с

распространенностью наследственно-детерминированных заболеваний человека показана многочисленными исследованиями [6, 12, 13, 15, 35–38]. Это определяет необходимость при планировании популяционно-генетических и медико-генетических исследований учитывать данные показатели [39–46].

Работа выполнена без финансирования на личные средства.

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. *Malecot G.* Isolation by distance // *Genetic Structure of Population* / Ed. Morton N.E. Honolulu: Univ. Hawaii Press, 1973. P. 72–75.
2. *Morton N.E.* Isolation by distance in human populations // *Ann. Hum. Genet.* 1977. V. 40, № 3. P. 361–365. doi: 10.1111/j.1469-1809.1977.tb00200.x
3. *Ельчинова Г.И.* Метрика, построенная через параметры изоляции расстоянием Малекко, как характеристика генетического сходства популяций // *Генетика*. 2000. Т. 36. № 6. С. 856–858. (El'chinova G.I.A Metric based on Malecot's parameters of isolation by distance as a characteristic of genetic similarity between populations // *Rus. J. Genetics*. 2000. V. 36. № 6. P. 706–707.)
4. *Ельчинова Г.И., Макаов А.Х.М., Зинченко Р.А.* Использование небиологических источников информации при генетических исследованиях популяций человека // В сборнике: молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск, 2016. С. 97–104.
5. *Ельчинова Г.И., Старцева Е.А., Мамедова Р.А. и др.* Популяционная структура Горно-Марийского района Республики Марий Эл // *Генетика*. 1995. Т. 31. № 10. С. 1425–1432. (El'chinova G.I., Zinchenko R.A., Kravchuk O.I. et al. Population structure of the Gorno-Mariiskii raion, Maria el republic // *Rus. J. Genetics*. 1995. V. 31. № 10. P. 1425–1432.)
6. *Ельчинова Г.И., Парадеева Г.М., Ревазов А.А. и др.* Медико-генетическое изучение населения Костромской области. Сообщение VI. Параметры изоляции расстоянием в популяциях Буйского и Шарьинского районов Костромской области // *Генетика*. 1988. Т. 24. № 7. С. 1276–1281.
7. *Hardy O., Vekemans X.* Isolation by distance in a continuous population: Reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models // *Heredity*. 1999. V. 83. P. 145–154. doi: 10.1046/j.1365-2540.1999.00558.x

8. *Sanna E., Melis M., Floris G.* Coefficient of relationship by isonymy between 14 Sardinian villages in the periods 1800–1824 and 1950–1974 // *Z. Morphol. Anthropol.* 2001. V. 83. № 1. P. 117–127.
9. *Santos C., Abade A., Lima M.* Testing hierarchical levels of population sub-structuring: the Azores islands (Portugal) as a case study // *J. Biosoc. Sci.* 2008. V. 40(4). P. 607–621.
10. *Ringbauer H., Kolesnikov A., Field D.L., Barton N.H.* Estimating Barriers to gene flow from distorted isolation-by-distance patterns // *Genetics.* 2018. V. 208(3). P. 1231–1245.
11. *McLean S.A.* Isolation by distance and the problem of the twenty-first century // *Hum. Biol.* 2021. V. 92(3). P. 167–179.
12. *Мамедова Р.А.* Влияние генетического дрейфа на территориальное распределение груза, а также спектр наследственных болезней в популяциях Кировской области: Автореф. дисс....канд. мед. наук. М., 1993. 23 с.
13. *Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Руденская Г.Е. и др.* Комплексное популяционно- и медико-генетическое исследование населения двух районов Тверской области // *Генетика.* 2004. Т. 40. № 5. С. 667–676. doi: 10.1023/B:RUGE.0000029157.14539.10 (*Zinchenko R.A., Elchinova G.I., Rudenskaia G.E., et al.* Integrated population genetic and medical genetic study of two raions of the Tver oblast // *Rus. J. Genetics.* 2004. V. 40. № 5. P. 537–545.)
14. *Кадошников М.Ю., Голубцова В.И., Ельчинова Г.И. и др.* Брачно-миграционная структура и коэффициент инбридинга в Адыгейской популяции // *Генетика.* 1991. Т. 27. № 2. С. 327–334.
15. *Мамедова Р.А., Ельчинова Г.И., Старцева Е.И. и др.* Генетическая структура и груз наследственных болезней в пяти популяциях Архангельской области // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 6. С. 837–841. (*Mamedova R.A., El'chinova G.I., Startseva E.A., et al.* Genetic structure and the load of hereditary diseases in five populations of Arkhangel'skaya oblast // *Rus. J. Genetics.* 1996. V. 32. № 6. P. 729–733.)
16. *Иванов В.П., Чурносоев М.И., Кириленко А.И.* Популяционно-демографическая структура населения Курской области. Миграционные процессы // *Генетика.* 1997. Т. 33. № 3. С. 375–380. (*Ivanov V.P., Churnosov M.I., Kirilenko A.I.* Population demographic structure in Krupskaya oblast: migration // *Rus. J. Genetics.* 1997. V. 33. № 3. P. 300–305.)
17. *Иванов В.П., Чурносоев М.И., Кириленко А.И.* Популяционно-демографическая структура населения Курской области. Изоляция расстоянием // *Генетика.* 1997. Т. 33. № 3. С. 381–386. (*Ivanov V.P., Churnosov M.I., Kirilenko A.I.* Population demographic structure in Krupskaya oblast: isolation by distance // *Rus. J. Genetics.* 1997. V. 33. № 3. P. 306–310.)
18. *Сладкова С.В., Ревазов А.А., Голубцов В.И., Кадошников М.Ю.* Анализ структуры городских и сельских популяций центральной части Краснодарского края // *Генетика.* 1990. Т. 26. № 11. С. 2070–2075.
19. *Ельчинова Г.И., Осипова Е.В., Зинченко Р.А. и др.* Брачно-миграционная характеристика городского и сельского населения Удмуртии // *Генетика.* 2006. Т. 42. № 4. С. 566–570. (*El'chinova G.I., Zinchenko R.A., Gavrilina S.G., et al.* Marriage-migration characteristics of the urban and rural populations of Udmurtia // *Rus. J. Genetics.* 2006. V. 42. № 4. P. 454–458.) doi: 10.1134/S1022795406040132
20. *Ельчинова Г.И., Симонов Ю.И., Вафина З.И., Зинченко Р.А.* Эндогамия и изоляция расстоянием в населении Татарстана // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 8. С. 1126–1130. (*El'chinova G.I., Simonov Y.I., Zinchenko R.A., Vafina Z.I.* Endogamy and isolation by distance in the Tatarstan population // *Rus. J. Genetics.* 2011. V. 47. № 8. P. 999–1003.) doi: 10.1134/S1022795411080059
21. *Ельчинова Г.И., Шакманов М.М., Ревазова Ю.А., Зинченко Р.А.* Популяционно-генетическая характеристика абазин Карачаево-Черкесии (по брачным миграциям и частотам распределения фамилий) // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 10. С. 1184–1190. doi: 10.7868/S0016675815100057. (*El'chinova G.I., Zinchenko R.A., Shakmanov M.M., Revazova Y.A.* Population and genetic characteristics of abazins in Karachay-Cherkessia (marital migrations and surname frequency distribution) // *Rus. J. Genetics.* 2015. V. 51. № 10. P. 1020–1025.) doi: 10.1134/S1022795415100051
22. *Ельчинова Г.И., Кадышев В.В., Зинченко Р.А.* Изоляция расстоянием у северных осетин // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 3. С. 358–360. doi: 10.31857/S0016675821030073 (*El'chinova G.I., Kadyshchev V.V., Zinchenko R.A.* Isolation by distance in north ossetians // *Rus. J. Genetics.* 2021. V. 57. № 3. P. 371–373.) doi: 10.1134/S1022795421030078
23. *Ельчинова Г.И., Гетоева З.К., Кадышев В.В. и др.* Популяционно-генетические параметры северо-осетинских кумыков // *Мед. генетика.* 2022. Т. 21(5). С. 42–45. doi: 10.25557/2073-7998.2022.05.42-45
24. *Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях* / Под ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука, 2004. 619 с.
25. *Ельчинова Г.И.* Опыт применения методов популяционно-генетического анализа при изучении популяций России с различной генетико-демографической структурой: Автореф. дисс....докт. биол. наук. М., 2001. 48 с.
26. *Сорокина И.Н., Балановская Е.В., Чурносоев М.И.* Генофонд населения Белгородской области. Параметры модели изоляции расстоянием Малеко // *Генетика.* 2009. Т. 45. № 3. С. 383–389. (*Sorokina I.N., Churnosov M.I., Balanovska E.V.* The gene pool of the Belgorod oblast

- population: malecot's isolation-by-distance parameters // *Rus. J. Genetics*. 2009. V. 45. № 3. P. 335–340.) doi: 10.1134/S1022795409030120
27. *Сорокина И.Н., Чурносков М.И., Балановская Е.В.* Генофонд населения Белгородской области. Динамика генетических соотношений популяций за последние 50 лет // *Генетика*. 2009. Т. 45. № 4. С. 555–563. (*Sorokina I.N., Churnosov M.I., Balanovska E.V.* The gene pool of the Belgorod oblast population: changes in population genetic relationships during the past 50 years // *Rus. J. Genetics*. 2009. V. 45. № 4. P. 486–494.) doi: 10.1134/S1022795409040140
  28. *Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Мухин В.Н., Осипенко С.Ю.* Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Этногеографические характеристики миграции в донецкой популяции // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 10. С. 1402–1408. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V., Osipenko S.Yu., Mukhin V.N.* Genetic demography of Ukrainian urban populations in the 1990s: ethnic geographic characteristics of migration in the Donetsk population // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 10. P. 1189–1195.) doi: 10.1023/A:1020609006063
  29. *Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Осипенко С.Ю.* Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Этнический состав миграционного потока харьковской популяции // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 7. С. 972–979. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V., Osipenko S.Yu.* Genetic demography of Ukrainian urban populations in the 1990s: the ethnic composition of the migration flow in the Kharkov population // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 7. P. 816–823.) doi: 10.1023/A:1016399823573.
  30. *Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Осипенко С.Ю.* Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Национальность и место рождения мигрантов полтавской популяции // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 9. С. 1276–1281. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V., Osipenko S.Yu.* Genetic demography of Ukrainian urban populations in the 1990s: ethnicity and birthplaces of migrants to the Poltava population // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 9. P. 1082–1087.) doi: 10.1023/A:1020200100784
  31. *Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Батлуцкая И.В., Сорокина И.Н.* Динамика популяционной структуры населения юга Центральной России за 130-летний период. Миграционные процессы // *Генетика*. 2024. Т. 60. № 8. С. 000.
  32. *Бубликов В.В.* Причины и последствия “этнической революции” 1930-х гг. на Белгородчине (часть I) // *Науч. ведомости. Серия Философия. Социология. Право*. 2016. № 24 (245). Выпуск 38. С. 38–46.
  33. *Чугунова Н.В.* Социально-демографическое развитие Белгородской области изменяющейся России. М.: ГЕОС, 2011. 140 с.
  34. *Бубликов В.В., Маркова В.В.* Формирование этнического состава населения Белгородской области (часть первая: XIX век – середина XX столетия) // *Науч. ведомости. Серия Философия. Социология. Право*. 2013. № 23 (166). Выпуск 26. С. 49–59.
  35. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2004. 431 с.
  36. *Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Биканов Р.А. и др.* Изучение роли основных факторов популяционной динамики в механизме дифференциации и в формировании разнообразия и отягощенности наследственной патологии в субпопуляциях Карачаево-Черкесской республики // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 6. С. 694–700. doi: 10.1134/S0016675819060213. (*Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Bikanov R.A., et al.* Study of the role of the main factors of population dynamics in the mechanism of differentiation and formation of diversity and genetic load of hereditary diseases in subpopulations of the Karachay-Cherkessia republic // *Rus. J. Genetics*. 2019. V. 55. № 6. P. 738–743.) doi: 10.1134/S1022795419060206
  37. *Ельчинова Г.И., Осипова Е.В., Зинченко Р.А.* Генетико-эпидемиологические исследования в Удмуртской республике: брачно-миграционные параметры городского и сельского населения // *Здоровье, демография, экология финно-угорских народов*. 2011. № 1. С. 45–50.
  38. *Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Безменова И.Н. и др.* Популяционно-генетические характеристики и генетико-эпидемиологическое исследование ассоциаций генов-кандидатов с мультифакториальными заболеваниями // *Науч. результаты биомед. исследований*. 2018. Т. 4. № 4. С. 20–30. doi: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-3
  39. *Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Ефремова О.А. и др.* Анализ уровня эндогамии популяции как основа популяционно-генетических и медико-генетических исследований // *Науч. результаты биомед. исследований*. 2021. Т. 7. № 4. С. 375–387. DOI: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-4
  40. *Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Toropova A.V. et al.* A replication study of genetic variants associated with high-level musical aptitude // *Res. Results in Biomedicine*. 2023. V. 9(2). P. 181–190. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-2-0-3
  41. *Ponomarenko I., Pasenov K., Churnosova M. et al.* Sex-hormone-binding globulin gene polymorphisms and breast cancer risk in caucasian women of Russia // *Int. J. Mol. Sci*. 2024. V. 25(4). Published 2024 Feb 11. doi:10.3390/ijms25042182
  42. *Abramova M., Churnosova M., Efremova O. et al.* Effects of pre-pregnancy overweight/obesity on the pattern of

- association of hypertension susceptibility genes with preeclampsia // *Life (Basel)*. 2022. V. 12(12). doi:10.3390/life12122018
43. Пасенов К.Н. Особенности ассоциаций SHBG-связанных генов с раком молочной железы у женщин в зависимости от наличия наследственной отягощенности и мутаций в генах *BRCA1/CHEK2* // Науч. результаты биомед. исследований. 2024. V. 10. № 1. P. 69–88. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4
  44. Novakov V., Novakova O., Churnosova M. et al. Polymorphism rs143384 GDF5 reduces the risk of knee osteoarthritis development in obese individuals and increases the disease risk in non-obese population // *Arthroplasty*. 2024. V. 6(1). P. 12. doi:10.1186/s42836-023-00229-9
  45. Minyaylo O., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene are associated with peptic ulcer disease in the Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 13515. doi.org/10.1038/s41598-021-92527-y.
  46. Иванова Т.А. Пол-специфические особенности межлокусных взаимодействий, определяющих подверженность к гипертонической болезни // Науч. результаты биомед. исследований. 2024. Т. 10. № 1. С. 53–68. doi: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-3.

## The Change in the Population Structure of the Kursk and Voronezh Guberniya in the First Half of the 20th Century. Malecot's Isolation by Distance

K. N. Sergeeva<sup>1</sup>, S. N. Sokorev<sup>1</sup>, Y. I. Goncharova<sup>1</sup>, A. S. Nevinnikh<sup>1</sup>,  
I. V. Batlutskaya<sup>1</sup>, I. N. Sorokina<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

\*e-mail: Sorokina\_5@mail.ru

The article presents the results of assessing the variability of parameters of the Malecot's distance model of isolation among the population of Kursk and Voronezh guberniya from 1890–1910 to 1951–1953. Over 60 years there was an increase in the level of local inbreeding (2.8 times), root-mean-square distances between the places of birth of spouses, taking into account long-distance migrations (3.7 times) and without them (5.44 times) and a decrease in the effective population size (2.8 times), the coefficient of linear systematic pressure (4.5 times).

**Keywords:** Malecot's model of isolation by distance, local inbreeding.

УДК 575.174

## ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ НАСЕЛЕНИЯ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ. ИЗОЛЯЦИЯ РАССТОЯНИЕМ МАЛЕКО

© 2024 г. К. Н. Сергеева<sup>1</sup>, С. Н. Сокорев<sup>1</sup>, Ю. И. Гончарова<sup>1</sup>,  
А. С. Невинных<sup>1</sup>, И. В. Батлуцкая<sup>1</sup>, И. Н. Сорокина<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия  
\*e-mail: Sorokina@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 25.02.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

В статье представлены результаты оценки динамики показателей модели изоляции расстоянием Малек среди населения Белгородской области с 1978–1980 гг. по 2016–2018 гг. При сравнении с данными за 1890–1910 гг. и 1951–1953 гг. в среднем по региону установлено увеличение сред-неквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (6.9 раза) и без них (13.3 раза), эффективного давления миграций (1.5 раза) и снижение коэффици-ента линейного систематического давления (11 раз), эффективного размера популяции (1.3 раза). Уровень локального инбридинга значительно снизился среди городского населения и сохранился среди сельского. Наиболее выраженные изменения параметров модели изоляции расстоянием Малек приходились на середину – вторую половину XX в. Различия по большинству показате-лей модели изоляции расстоянием Малек между городом и селом, максимально выраженные в конце XIX в., уменьшались в ряду поколений и практически нивелировались к 2016–2018 гг.

**Ключевые слова:** модель изоляции расстоянием Малек, локальный инбридинг.

**DOI:** 10.31857/S0016675824090117 **EDN:** ADJYLZ

Изучение популяционно-генетических особен-ностей различных групп народонаселения прово-дится с использованием различных моделей, одной из которых является модель изоляции расстояни-ем Малек [1–3]. Данная модель учитывает влия-ние географических расстояний на генетическое разнообразие популяций и позволяет оценивать уровень генетической дифференциации насе-ления, определять факторы, оказывающие влияние на генетические особенности популяции [3]. Мо-дель изоляции расстоянием Малек успешно при-меняется с конца XX в. во многих популяционных исследованиях различных этно-территориальных групп населения [3–15].

Настоящее сообщение продолжает серию работ [16, 17], посвященных изучению динамики ряда популяционно-демографических показателей сре-ди населения юга Центральной России, и является продолжением исследования динамики параме-тров модели изоляции расстоянием Малек [17] среди населения Белгородской области за период с 1951 г. по 2018 г.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект настоящего исследования — населе-ние районных популяций Белгородской области

(Белгородский, Старооскольский, Новоосколь-ский, Корочанский, Грайворонский, Валуйский, Алексеевский, Красногвардейский районы). Де-тальные характеристики изучаемых районов и критерии их включения изложены в ранее пред-ставленных работах [16, 17]. Исследование прово-дилось за три временных периода: 1978–1980 гг., 1991–1993 гг. и 2016–2018 гг.

Материалом служили данные актов гражданско-го состояния областного архива ЗАГС за 1978–1980 гг. (10991 записей), 1991–1993 гг. (4508 записей) и 2016–2018 гг. (5467 записей) суммарным объемом 20966 расстояний между местами рождения супру-гов. Методические особенности расчетов параме-тров изоляции расстоянием Малек представлены в предыдущих работах [14, 17]. Анализ проводился на уровне районов [18]. Для оценки тенденций ди-намики показателей модели изоляции расстоянием Малек использовались данные по пяти вре-менным периодам: 1890–1910 гг., 1951–1953 гг., 1978–1980 гг., 1991–1993 гг. и 2016–2018 гг. (пер-вые два периода рассмотрены ранее [17]). Таким образом, динамика параметров изоляции нами была рассмотрена за 130-летний период (с 1890 по 2018 г.).

С целью оценки взаимосвязи между параме-трами изоляции расстоянием Малек и другими

изучаемыми популяционно-демографическими показателями (доли браков, заключаемых между выходцами из разных областей, из одной области, из одного района, из одного села (эти показатели были представлены ранее [16])) проводился корреляционный анализ (рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена) по пяти временным периодам (первые два периода рассмотрены ранее [17]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Параметры модели изоляции расстоянием Малёко среди населения юга Центральной России*

1. 1978–1980 гг. В 1978–1980 гг. выявлена значительная вариабельность большинства показателей модели изоляции расстоянием Малёко по районам Белгородской области (табл. 1). Максимальная изменчивость установлена для эффективного размера популяции (9.8 раз, от 10156 до 99219), локального инбридинга (9 раз, от 0.00003 до 0.00027), коэффициента линейного систематического давления (4.8 раза, от 0.000152 до 0.00722) и среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов без учета дальних миграций (4.7 раза, от 58.3 км до 274.42 км). Значение локального инбридинга в среднем по области составляло 0.00012. Минимальные значения данного показателя характерны для районов с максимальным эффективным размером популяции, в составе которых находится крупный город, — это Белгородский (0.00003), Старооскольский (0.00005), Алексеевский (0.00007), Валуйский (0.00009) районы. Максимальные значения локального инбридинга отмечались в Грайворонском районе (0.00027), испытывавшем низкое давление миграций (0.092) при минимальном эффективном размере популяции ( $N_e = 10156$ ).

Анализ городского и сельского населения Белгородской обл. показал, что в городе в среднем выше эффективный размер популяции (в 3.3 раза), среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (в 1.2 раза) и без них (в 1.4 раза). Низкое значение локального инбридинга (0.00021) обусловлено тем, что эффективный размер популяции в городе в среднем в 3.34 раза выше, а коэффициент линейного систематического давления и эффективное давление миграций ниже (в 1.9 и 1.6 раза соответственно), чем в сельской местности (табл. 1).

2. 1991–1993 гг. В 1991–1993 гг. значительная вариабельность установлена по показателю локального инбридинга (16 раз, от 0.00002 до 0.00029) и эффективного размера популяции (14.4 раза, от 8851 до 127708) (табл. 2). Несколько меньшая изменчивость отмечалась для коэффициента линейного систематического давления (1.8 раза, от

0.00191 до 0.00352), среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов без учета дальних миграций (1.7 раз, от 135.44 км до 230.34 км) и половины доли дальних миграций (1.6 раз, от 0.017 до 0.027).

Значения коэффициента локального инбридинга были минимальны (0.00002–0.00003) в районах с максимальным эффективным размером популяции, в состав которых входил крупный город, — в Белгородском, Старооскольском районах. Максимальные значения локального инбридинга (0.00029) отмечались в Грайворонском районе, испытывавшем наименьшее давление миграций (0.097) при минимальном эффективном размере популяции (8851) (табл. 2).

В городских популяциях в среднем эффективный размер популяции был выше в 4.7 раза, а уровень локального инбридинга ниже в 5 раз по сравнению с сельским населением (табл. 2).

3. 2016–2018 гг. В 2016–2018 гг. максимальная вариабельность установлена для эффективного размера популяции (17.2 раза, от 9905 до 170230) и локального инбридинга (17.2 раза, от 0.00001 до 0.00024) (табл. 3). Несколько меньшая изменчивость отмечалась для коэффициента линейного систематического давления (2 раза, от 0.00216 до 0.00427), среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (1.5 раза, от 207.55 км до 311.00 км) и без них (1.8 раза, от 115.64 км до 211.01 км).

Минимальные значения локального инбридинга наблюдались в районах (Белгородский (0.00001) и Старооскольский (0.00003)), характеризующихся высоким уровнем урбанизации и отличающихся максимальным эффективным размером популяции. Максимальное значение данного показателя (0.00024) установлено в Грайворонском районе, испытывавшем низкое давление миграций (0.0105) при минимальном эффективном размере популяции (9905) (табл. 3).

Анализ параметров модели изоляции расстоянием Малёко, проведенный для жителей г. Белгорода и сельского населения Белгородского района, показал, что, несмотря на примерно одинаковую миграционную нагрузку, значение локального инбридинга в городе (0.00002) в 3 раза ниже, а эффективный размер популяции ( $N_e = 130518$ ) в 3.3 раза выше, чем среди жителей села. По другим показателям модели изоляции расстоянием Малёко значимых отличий не выявлено (табл. 3).

### *Тенденции динамики основных показателей модели изоляции расстоянием Малёко среди населения юга Центральной России*

На завершающем этапе работы был проведен анализ направлений динамики основных

Таблица 1. Параметры модели изоляции расстоянием Малек среди населения Белгородской области в 1978–1980 гг.

| Районы               | $N$  | $\sigma$ | $\sigma'$ | $m$   | $k$   | $M_e$ | $N_e$ | $a$     | $b$     |
|----------------------|------|----------|-----------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|
| Белгородский         | 3385 | 294.30   | 256.24    | 0.013 | 0.371 | 0.098 | 99219 | 0.00003 | 0.00173 |
| город                | 2342 | 296.68   | 257.40    | 0.013 | 0.387 | 0.101 | 79372 | 0.00003 | 0.00175 |
| село                 | 1043 | 288.90   | 257.54    | 0.011 | 0.335 | 0.085 | 19847 | 0.00015 | 0.00160 |
| Старооскольский      | 2236 | 310.77   | 274.42    | 0.013 | 0.301 | 0.087 | 54186 | 0.00005 | 0.00152 |
| город                | 1266 | 351.28   | 350.16    | 0.000 | 0.355 | 0.017 | 38677 | 0.00039 | 0.00052 |
| село                 | 970  | 248.12   | 171.40    | 0.023 | 0.242 | 0.107 | 15509 | 0.00015 | 0.00270 |
| Новооскольский       | 872  | 254.31   | 189.65    | 0.020 | 0.272 | 0.106 | 16480 | 0.00014 | 0.00243 |
| Корочанский          | 863  | 210.38   | 137.74    | 0.023 | 0.301 | 0.119 | 15050 | 0.00014 | 0.00354 |
| Грайворонский        | 497  | 274.14   | 224.01    | 0.015 | 0.274 | 0.092 | 10156 | 0.00027 | 0.00192 |
| Валуйский            | 1249 | 242.16   | 180.81    | 0.019 | 0.285 | 0.106 | 74985 | 0.00009 | 0.00255 |
| Красногвардейский    | 1042 | 142.46   | 58.30     | 0.019 | 0.195 | 0.089 | 18268 | 0.00015 | 0.00722 |
| Алексеевский         | 847  | 218.82   | 138.62    | 0.023 | 0.292 | 0.118 | 29234 | 0.00007 | 0.00351 |
| В среднем по области | 1374 | 243.42   | 182.48    | 0.018 | 0.286 | 0.102 | 39697 | 0.00012 | 0.00305 |
| город                | 1804 | 323.98   | 303.78    | 0.007 | 0.371 | 0.059 | 59025 | 0.00021 | 0.00114 |
| село                 | 1007 | 268.51   | 214.47    | 0.017 | 0.288 | 0.096 | 17678 | 0.00015 | 0.00215 |

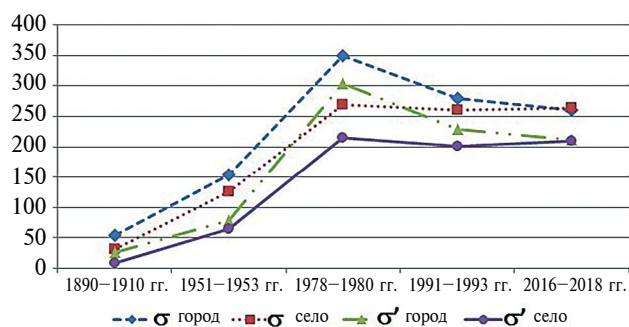
Примечание для табл. 1–3.  $\sigma$  – среднеквадратическое расстояние между местами рождения супругов с учетом дальних миграций;  $\sigma'$  – среднеквадратическое расстояние между местами рождения супругов без учета дальних миграций;  $m$  – половина доли дальних миграций;  $k$  – половина доли промежуточных миграций;  $M_e$  – эффективное давление миграций;  $N_e$  – эффективный размер популяции;  $a$  – локальный инбридинг;  $b$  – коэффициент линейного систематического давления.

Таблица 2. Параметры модели изоляции расстоянием Малеко среди населения Белгородской области в 1991–1993 гг.

| Районы               | $N$               | $\sigma$ | $\sigma'$ | $m$   | $k$   | $M_e$ | $N_e$  | $a$     | $b$     |
|----------------------|-------------------|----------|-----------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|
| Белгородский         | 1185              | 263.79   | 200.00    | 0.019 | 0.310 | 0.111 | 127708 | 0.00002 | 0.00236 |
|                      | город             | 957      | 256.18    | 0.019 | 0.312 | 0.116 | 103831 | 0.00002 | 0.00249 |
|                      | село              | 228      | 293.59    | 0.015 | 0.320 | 0.100 | 23877  | 0.00010 | 0.00180 |
| Старооскольский      | 677               | 272.05   | 218.87    | 0.017 | 0.305 | 0.103 | 72361  | 0.00003 | 0.00208 |
|                      | город             | 380      | 302.70    | 0.012 | 0.379 | 0.095 | 61333  | 0.00004 | 0.00163 |
|                      | село              | 297      | 226.87    | 0.020 | 0.222 | 0.097 | 11027  | 0.00023 | 0.00286 |
| Новооскольский       | 312               | 239.98   | 149.16    | 0.027 | 0.267 | 0.124 | 15605  | 0.00013 | 0.00334 |
|                      | Корочанский       | 362      | 287.83    | 0.025 | 0.262 | 0.117 | 13266  | 0.00016 | 0.00237 |
|                      | Грайворонский     | 235      | 293.99    | 0.019 | 0.236 | 0.097 | 8851   | 0.00029 | 0.00191 |
| Валуйский            | 675               | 258.13   | 187.66    | 0.021 | 0.267 | 0.109 | 23958  | 0.00010 | 0.00249 |
|                      | Красногвардейский | 489      | 217.88    | 0.024 | 0.262 | 0.113 | 15561  | 0.00014 | 0.00352 |
|                      | Алексеевский      | 573      | 259.73    | 0.023 | 0.246 | 0.108 | 21809  | 0.00011 | 0.00259 |
| В среднем по области | 564               | 261.67   | 188.17    | 0.022 | 0.269 | 0.110 | 37390  | 0.00012 | 0.00258 |
|                      | город             | 669      | 279.44    | 0.016 | 0.346 | 0.104 | 82582  | 0.00003 | 0.00206 |
|                      | село              | 263      | 260.23    | 0.018 | 0.271 | 0.099 | 17452  | 0.00017 | 0.00233 |

Таблица 3. Параметры модели изоляции расстоянием Малеко среди населения Белгородской области в 2016–2018 гг.

| Районы          | $N$                  | $\sigma$ | $\sigma'$ | $m$   | $k$   | $M_e$ | $N_e$   | $a$     | $b$     |
|-----------------|----------------------|----------|-----------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| Белгородский    | 1128                 | 262.31   | 210.31    | 0.017 | 0.301 | 0.103 | 170 230 | 0.00001 | 0.00216 |
|                 | город                | 568      | 260.20    | 0.017 | 0.298 | 0.101 | 130 518 | 0.00002 | 0.00213 |
|                 | село                 | 560      | 264.43    | 0.019 | 0.303 | 0.105 | 39 712  | 0.00006 | 0.00219 |
| Старооскольский | 1187                 | 252.65   | 185.86    | 0.019 | 0.228 | 0.096 | 86 841  | 0.00003 | 0.00236 |
|                 | Новооскольский       | 413      | 311.00    | 0.023 | 0.276 | 0.115 | 13 733  | 0.00016 | 0.00227 |
|                 | Корочанский          | 360      | 273.81    | 0.019 | 0.281 | 0.106 | 13 193  | 0.00018 | 0.00222 |
| Грайворонский   | 333                  | 266.07   | 195.41    | 0.021 | 0.251 | 0.105 | 9 905   | 0.00024 | 0.00234 |
|                 | Валуйский            | 812      | 272.31    | 0.023 | 0.323 | 0.125 | 22 029  | 0.00009 | 0.00259 |
|                 | Красногвардейский    | 514      | 207.55    | 0.021 | 0.321 | 0.119 | 12 250  | 0.00017 | 0.00370 |
| Алексеевский    | 720                  | 209.58   | 115.64    | 0.024 | 0.303 | 0.122 | 20 457  | 0.00010 | 0.00427 |
|                 | В среднем по области | 683      | 256.91    | 0.021 | 0.285 | 0.111 | 43580   | 0.00012 | 0.00274 |



**Рис. 1.** Динамика среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций ( $\sigma$ ) и без учета дальних миграций ( $\sigma'$ ) среди городского и сельского населения.

показателей модели изоляции расстоянием Малеко с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг. в разрезе пяти временных периодов (первые два периода изучены нами ранее [17]). Были выявлены следующие разнонаправленные тенденции.

Во-первых, по региону в среднем значительно увеличились среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (в 6.9 раза, от 37.40 км до 256.91 км) и без них (в 13.3 раза, от 13,62 км до 181,38 км) с максимальной динамикой в период с 1890–1910 гг. до 1978–1980 гг. За 130-летний период произошло снижение коэффициента линейного систематического давления (в 11 раз) и увеличение доли дальних миграций (в 1.6 раз), промежуточных миграций (в 1.4 раза), эффективного давления миграций (в 1.5 раза). Эффективный размер популяции за 130 лет уменьшился (в 1.3 раза) при максимально резком снижении данного показателя (в 3.6 раза) с конца XIX в. к 1951–1953 гг. и постепенном росте в последующих поколениях. При этом за

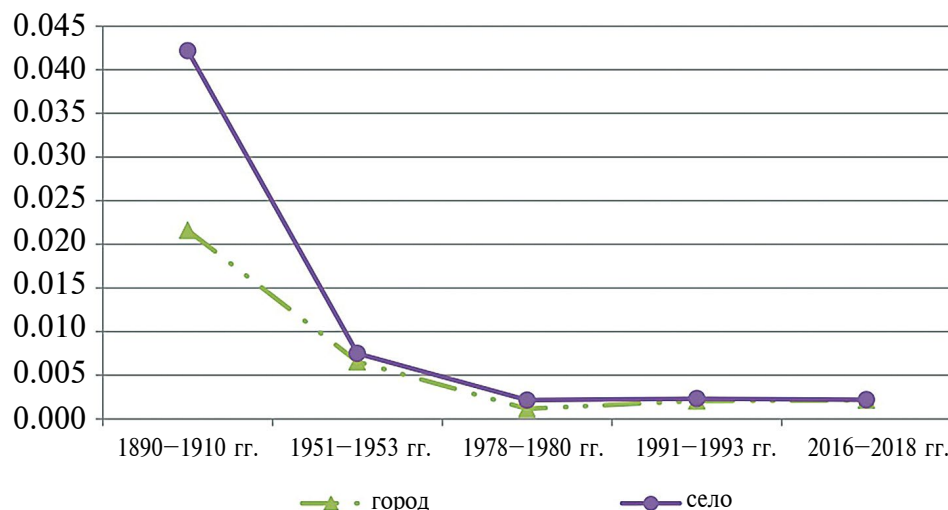
исследуемый 130-летний период в 2 раза увеличились значения локального инбридинга, и динамика данного показателя была диаметрально противоположна изменениям коэффициента линейного систематического давления.

Следует отметить, что значимые изменения параметров модели изоляции расстоянием Малеко приходились на середину XX в. (1951–1953 гг.) и последующее поколение, о чем свидетельствуют резкие изменения на графиках — рост одних показателей и уменьшение других.

Во-вторых, за 130-летний период среди городского и сельского населения юга Центральной России по большинству показателей изоляции расстоянием Малеко отмечались однонаправленные тенденции изменчивости: увеличение среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций и без них, эффективного давления миграций, уменьшение коэффициента линейного систематического давления (рис. 1–5). При этом среди сельского населения наблюдалась более выраженная динамика по среднеквадратическим расстояниям между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (9.6 раз) и без них (22 раза) (рис. 1), коэффициенту линейного систематического давления (19.3 раза) (рис. 2) по сравнению с городским населением (4.9, 8.4 и 10 раз соответственно).

Динамика показателя эффективного размера популяции среди городского и сельского населения была разнонаправлена (рис. 4). В городской части популяции за 130 лет значения эффективного размера популяции увеличились в 33.6 раза, а в сельской части уменьшились в 1.3 раза (рис. 4).

Реверсивной динамикой характеризовался уровень локального инбридинга. Так, если в 1890–1910 гг. значение локального инбридинга в городе было



**Рис. 2.** Динамика коэффициента линейного систематического давления ( $b$ ) среди городского и сельского населения.

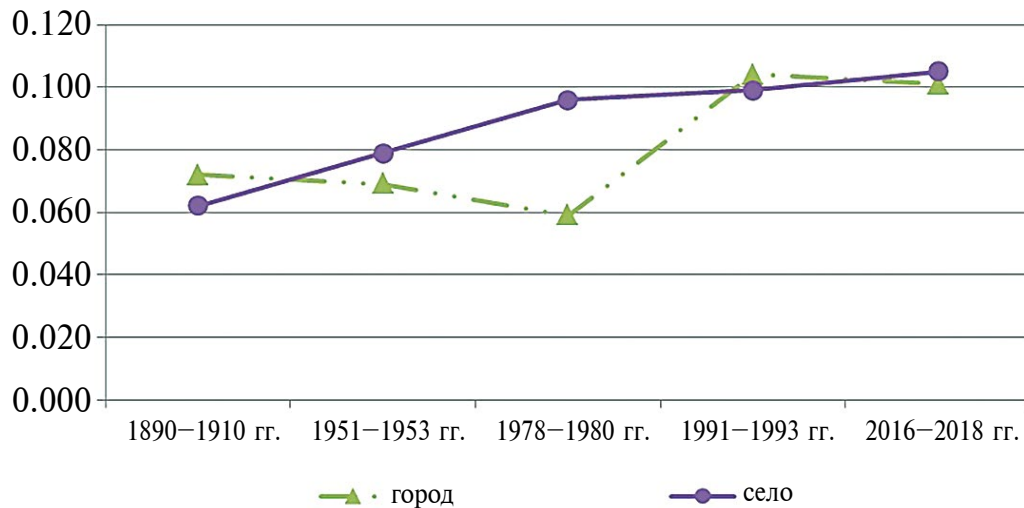


Рис. 3. Динамика эффективного давления миграций ( $M_e$ ) среди городского и сельского населения.

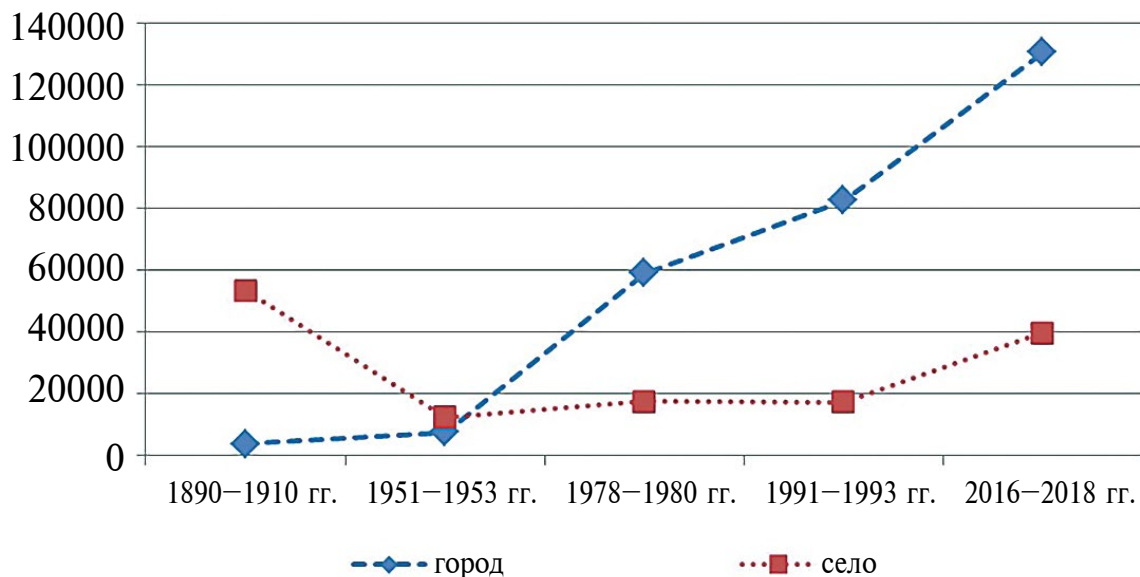


Рис. 4. Динамика эффективного размера популяции ( $N_e$ ) среди городского и сельского населения.

в 19.5 раз выше, чем в селе, то к 2016–2018 гг. показатель локального инбридинга стал в 3 раза выше в селе по сравнению с городом. При этом для городской части популяции наблюдалось стабильно выраженное снижение данного показателя (в 78 раз) в течение всего периода, тогда как в сельской части наблюдалась вариабельность по пяти периодам при уменьшении за 130 лет лишь в 1.3 раза (рис. 5).

Важно подчеркнуть, что за 130-летний период различия по подавляющему большинству показателей модели изоляции расстоянием Малеко между городом и селом, максимально выраженные в конце XIX в., уменьшались в ряду поколений и практически нивелировались к 2016–2018 гг. (за

исключением эффективного размера популяции и локального инбридинга) (рис. 1–5).

В-третьих, анализ корреляционных взаимосвязей между параметрами изоляции расстоянием Малеко и брачно-миграционными характеристиками населения (представлены ранее в работе [16]) за пять временных периодов (первые два периода рассмотрены ранее [17]) (табл. 4) показал, что с увеличением доли браков, заключаемых между выходцами из разных областей, и уменьшением доли браков, заключаемых в пределах области и района, увеличивались среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций и снижался коэффициент линейного

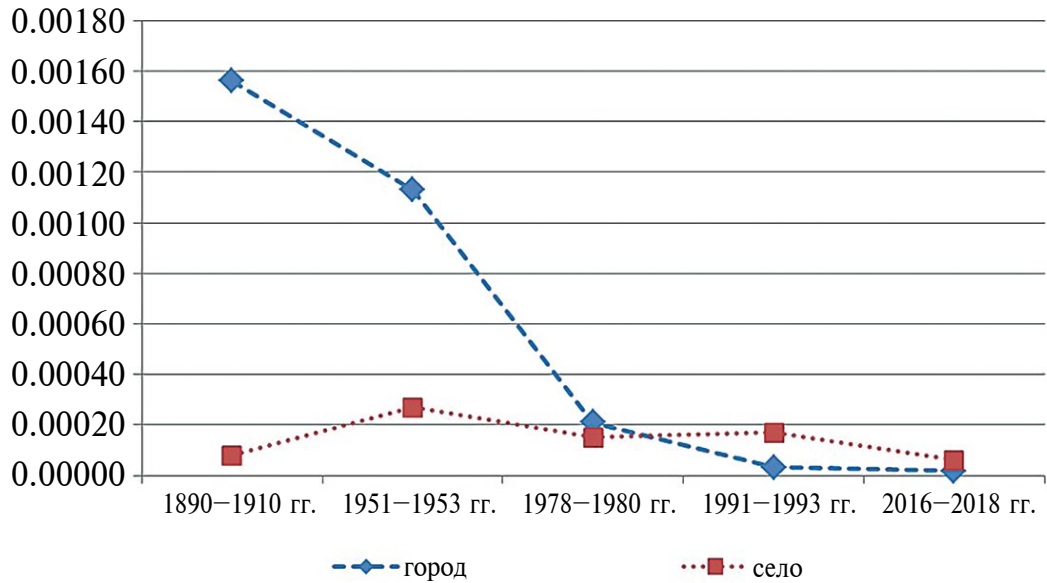


Рис. 5. Динамика локального инбридинга (а) среди городского и сельского населения.

систематического давления. Данная тенденция и направленность корреляционных взаимосвязей просматривались среди городского населения и отсутствовали среди сельского.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ параметров модели изоляции расстоянием Малек показал изменения в белгородской популяции (более выражено среди городского населения) уровня локального инбридинга. При этом за 130-летний период эффективный размер популяции в Белгородской области уменьшился (в 1.3 раза) при максимально резком снижении данного показателя (в 2.9 раза) с конца XIX в. к 1951–1953 гг. [17] и постепенном его росте в последующих поколениях до 1991–1993 гг. Причины данных изменений описаны нами в предыдущем сообщении [17] и связаны с административно-территориальными преобразованиями уездов в районы, границы которых значительно уменьшились с конца XIX в. к началу XXI в.

В современных границах Белгородская область была образована в послевоенный период – в 1954 г. Численность области и эффективный размер популяции начали постепенно увеличиваться, о чем подробно было описано нами ранее [16]. Об увеличении миграционного притока свидетельствует рост таких показателей, как среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (в 6.9 раза, от 37.40 км до 256.91 км) и без них (в 13.3 раза, от 13.62 км до 181.38 км), с максимальной динамикой в период с 1890–1910 до 1978–1980 гг. Это свидетельствует о значительном расширении круга брачных миграций.

За изучаемый нами период времени произошло увеличение эффективного давления миграций (в 1.5 раза), доли дальних миграций (в 1.6 раза) (наиболее значимо это происходило с 1951–1953 по 1978–1980 гг.). Также зарегистрировано выраженное уменьшение (в 11 раз) коэффициента линейного систематического давления (с максимальной динамикой с 1890–1910 гг. по 1978–1980 гг.). При этом за последние два поколения (с 1978–1980 гг.

Таблица 4. Значимые коэффициенты корреляции Спирмена между параметрами модели изоляции расстоянием и брачными миграциями в Белгородской области по пяти периодам

| Изучаемые показатели                                                         | Доля выходцев из разных областей | Доля выходцев из одной области | Доля выходцев из одного района |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов ( $\sigma$ ) | 0.90 ( $p = 0.037$ )             | –0.90 ( $p = 0.037$ )          | –0.90 ( $p = 0.037$ )          |
| Коэффициент линейного систематического давления ( $b$ )                      | –0.90 ( $p = 0.037$ )            | 0.90 ( $p = 0.037$ )           | 0.90 ( $p = 0.037$ )           |

по 2016–2018 гг.) вышеуказанные показатели изменялись незначительно.

Ранее Л.А. Атраментовой при изучении пространственной характеристики брачных миграций в белгородской популяции за 1960 г., 1985 г. и 1995 г. было установлено увеличение брачных расстояний с 590 км до 891 км и снижение показателя  $b$  от 0.00110 до 0.00062 за исследуемый период, что свидетельствовало о “повышении генетической эффективности миграции” [19].

Следует отметить, что направленность динамики большинства показателей параметров модели Малеко по Белгородской области за 130 лет демонстрирует сходную с московской популяцией тенденцию, наблюдаемую примерно в том же временном интервале (1892–1918 гг., 1955 г., 1980 г., 1994–1995 гг.), за исключением масштабов изменений [9, 13, 20–22]. Так, степень изоляции расстоянием в Москве в середине XX в. по сравнению с его началом уменьшилась вдвое, а к концу века – втрое, при этом изменчивость величины эффективного давления миграций была минимальна на протяжении 100 лет, а в 1994–1995 гг. снизилась. Следует отметить, что в белгородской популяции также отмечалась минимальная динамика показателя эффективного давления миграций, но в отличие от московской, эффективное давление миграций увеличивалось на протяжении 130 лет (в среднем в 1.3 раза). Доли «ближних» миграций и «дальних» миграций увеличились как в московской [11, 13], так и в белгородской популяции (наши данные).

Аналогичная тенденция параметров модели изоляции расстоянием Малеко, что и в Москве, наблюдалась в Донецке (1960, 1985, 1992 гг.) [23], Харькове (1960, 1985, 1993 гг.) [24], Полтаве (1960, 1985, 1995 гг.) [25], где более чем за 30 лет увеличились “дальние” и “ближние” миграции и уменьшились степень изоляции расстоянием и величина эффективного давления миграций [13, 23–25].

Следует отметить, что динамика основных параметров изоляции расстоянием Малеко различалась среди городского и сельского населения Белгородского региона. Так, с конца XIX в. до начала XXI в. эффективный размер популяции среди городского населения увеличился (рис. 4), а уровень локального инбридинга уменьшился по сравнению с сельским населением (рис. 5). Стабильный рост эффективного размера городов наблюдался с 1951–1953 гг. последующие три поколения до 2016–2018 гг. (за счет возникновения новых молодых городов в области). Эффективный размер сельского населения практически не изменился в этот временной промежуток и лишь незначительно увеличился за последнее поколение. При этом за 130-летний период различия по большинству показателей модели изоляции расстоянием Малеко между городом и селом, максимально выраженные в конце XIX

в., уменьшались в ряду поколений и практически нивелировались к 2016–2018 гг. (за исключением эффективного размера популяции и локального инбридинга).

Полученные нами результаты динамики показателей модели изоляции расстоянием Малеко в Белгородском регионе согласуются с данными по соседней Курской области [10, 26], где ранее был проведен анализ динамики показателей Малеко за 30-летний период (1960–1963, 1987–1990 гг.). Коэффициент локального инбридинга по районам Курской области изменялся в пределах от 0.00005 в Железнодорожном районе до 0.00043 в Поньковском районе, тогда как в соседней Белгородской области (наши данные) в среднем он равнялся 0.00012 (в 1991–1993 гг.). Как и в Белгородском регионе, районы Курской области, имеющие в своем составе города, характеризовались минимальным уровнем инбридинга ( $a = 0.00005–0.000087$ ). Однако в городах Белгородской области (наши данные) он был еще ниже (в среднем 0.00003 в 1991–1993 гг.). В большинстве популяций Курской области было установлено уменьшение коэффициента линейного систематического давления за 30-летний период, что согласуется с нашими данными по Белгородскому региону. Динамика локального инбридинга в Курском регионе (так же как и в Белгородском регионе) в основном определялась изменением эффективного размера популяции. За 30-летний период наблюдалось увеличение эффективной численности населения в городах (г. Курск и г. Льгов) и в целом в Железнодорожном и Курчатовском районах (за счет возникших молодых городов) и ее уменьшение в сельских популяциях. За период с 1960–1963 гг. по 1987–1990 гг. было установлено увеличение среднего расстояния между местами рождения супругов среди сельского населения и снижение данных показателей среди городских жителей. В исследовании отмечалось, что за последнее поколение различия в радиусе брачных миграций между городским и сельским населением области уменьшились. В отличие от Белгородской области уровень локального родства и коэффициент линейного систематического давления во всех рассмотренных популяциях среди сельского и городского населения, кроме Железнодорожного района, были одинаковы [10, 26].

Следует отметить, что значения локального инбридинга среди населения Белгородской области не выбиваются из ряда таковых значений по другим русским популяциям и значительно отличаются от аналогичных показателей изолированных и “нативных” популяций [11–13, 27]. Так, например, наши данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований среди русского населения Костромской области (в Шарьинском р-не  $a = 0.000161$ , в Буйском р-не  $a = 0.000161$ ) [28], Кировской области ( $a = 0.000106–0.001495$ ) [29, 30],

Архангельской области (в Виноградском р-не  $a = 0.000565$ , в Красноборском р-не  $a = 0.000472$ ) [31], но ниже, чем в Тверской области (в Осташковском р-не  $a = 0.00110$ , в Удомельском р-не  $a = 0.0045$ ) [32], в Семипалатинской области (Абайский р-н,  $a = 0.0003$ ) [33]. Российским сельским популяциям соответствовал локальный инбридинг удмуртов, который изменялся от 0.00027 в Игринском районе до 0.00065 – в Дебесском (в среднем  $a = 0.00035$ ) [34, 35], черкесов ( $a = 0.00034$ ) (усредненное значение для карачаевцев на конец XX в.  $a = 0.00029$ ) [36].

Несколько отличные от вышеперечисленных русских популяций значения локального инбридинга установлены для народов Кавказа и Поволжья: Адыгейская автономная область Краснодарского края ( $a = 0.00397$ ) [11], Республика Чувашия (в городе  $a = 0.000189$ , в районе  $a = 0.000318$ ) [12], Республика Северная Осетия – Алания (кумыки Моздокского р-на,  $a = 0.00067$ ) [36, 37], Карачаево-Черкесская Республика ( $a = 0.00007–0.00304$ , для аулов черкесов – 0.0017–0.0047 и от 0.001 до 0.003 – для абазинских аулов) [27, 38–40], а также для Татарстана ( $a = 0.0001–0.0008$ , для татар  $a = 0.00170–0.00291$ ) [41] и Башкортостана (башкир шести сельских р-нов  $a = 0.00012–0.00074$ ) [42].

Следует отметить, что многочисленными исследованиями показано важное медико-генетическое значение параметров изоляции популяций (локального инбридинга, миграций и др.), которые влияют на распространенность как моногенной наследственной патологии, так и других наследственно-детерминированных заболеваний среди населения [22, 27–29, 31–33, 35, 43]. В связи с этим данные показатели необходимо учитывать при планировании популяционно-генетических и медико-генетических исследований [44–51].

Работа выполнена без финансирования на личные средства.

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. *Malecot G.* Isolation by distance // *Genetic Structure of Population* / Ed. Morton N.E. Honolulu: Univ. Hawaii Press, 1973. P. 72–75.
2. *Morton N.E.* Isolation by distance in human populations // *Ann. Hum. Genet.* 1977. V. 40. № 3. P. 361–365. doi: 10.1111/j.1469-1809.1977.tb00200.x
3. *Ельчинова Г.И.* Метрика, построенная через параметры изоляции расстоянием Малекот, как характеристика генетического сходства популяций // *Генетика*. 2000. Т. 36. № 6. С. 856–858. (*El'chinova G.I.A* Metric based on Malecot's parameters of isolation by distance as a characteristic of genetic similarity between populations // *Rus. J. Genetics*. 2000. V. 36. № 6. P. 706–707.)
4. *Hardy O., Vekemans X.* Isolation by distance in a continuous population: Reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models // *Heredity*. 1999. V. 83. P. 145–154. doi: 10.1046/j.1365-2540.1999.00558.x
5. *Santos C., Abade A., Lima M.* Testing hierarchical levels of population sub-structuring: the Azores islands (Portugal) as a case study // *J. Biosoc. Sci.* 2008. V. 40(4). P. 607–621.
6. *Ringbauer H., Kolesnikov A., Field D.L., Barton N.H.* Estimating Barriers to gene flow from distorted isolation-by-distance patterns // *Genetics*. 2018. V. 208(3). P. 1231–1245.
7. *McLean S.A.* Isolation by distance and the problem of the twenty-first century // *Hum. Biol.* 2021. V. 92(3). P. 167–179.
8. *Ельчинова Г.И., Парадеева Г.М., Ревазов А.А. и др.* Медико-генетическое изучение населения Костромской области. Сообщение VI. Параметры изоляции расстоянием в популяциях Буйского и Шарьинского районов Костромской области // *Генетика*. 1988. Т. 24. № 7. С. 1276–1281.
9. *Победоносцева Е.Ю., Свежинский Е.А., Курбатова О.Л.* Генетико-демографические процессы в московской популяции в середине 90-х годов. Анализ этногеографических параметров миграции: изоляция расстоянием // *Генетика*. 1998. Т. 34. № 3. С. 332–339. (*Pobedonostseva E. Yu., Svezhinskii E.A., Kurbatova O.L.* Genetic demography of the Moscow population in the mid-1990s: analysis of ethnogeographic migration parameters (isolation by distance) // *Rus. J. Genetics*. 1998. V. 34. № 3. P. 423–430.)
10. *Иванов В.П., Чурносков М.И., Кириленко А.И.* Популяционно-демографическая структура населения Курской области. Изоляция расстоянием // *Генетика*. 1997. Т. 33. № 3. С. 381–386. (*Ivanov V.P., Churnosov M.I., Kirilenko A.I.* Population demographic structure in Kurskaya oblast: isolation by distance // *Rus. J. Genetics*. 1997. V. 33. № 3. P. 306–310.)
11. *Кадошников М.Ю., Голубцова В.И., Ельчинова Г.И. и др.* Брачно-миграционная структура и коэффициент инбридинга в Адыгейской популяции // *Генетика*. 1991. Т. 27. № 2. С. 327–334.
12. *Ельчинова Г.И., Рощина Ю.В., Зинченко Р.А. и др.* Популяционно-генетическое исследование Алатырского района Республики Чувашия // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 2. С. 251–258. (*El'chinova G.I., Roshchina Yu.V., Zinchenko R.A., et al.* Population genetic study of the Alatyr' raion of the republic of Chuvashia

- // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 2. P. 188–195.)  
doi: 10.1023/A:1014338212050
13. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука, 2004. 619 с.
  14. Сорокина И.Н., Балановская Е.В., Чурносоев М.И. Генофонд населения Белгородской области. Параметры модели изоляции расстоянием Малеко // *Генетика*. 2009. Т. 45. № 3. С. 383–389. (*Sorokina I.N., Churnosov M.I., Balanovska E.V.* The gene pool of the Belgorod oblast population: Malecot's isolation-by-distance parameters // *Rus. J. Genetics*. 2009. V. 45. № 3. P. 335–340.)  
doi: 10.1134/S1022795409030120
  15. Сорокина И.Н., Чурносоев М.И., Балановская Е.В. Генофонд населения Белгородской области. Динамика генетических соотношений популяций за последние 50 лет // *Генетика*. 2009. Т. 45. № 4. С. 555–563. (*Sorokina I.N., Churnosov M.I., Balanovska E.V.* The gene pool of the Belgorod oblast population: changes in population genetic relationships during the past 50 years // *Rus. J. Genetics*. 2009. V. 45. № 4. P. 486–494.)  
doi: 10.1134/S1022795409040140
  16. Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Батлуцкая И.В., Сорокина И.Н. Динамика популяционной структуры населения юга Центральной России за 130-летний период. Миграционные процессы // *Генетика*. 2024. Т. 60. № 8. С. 100–117.
  17. Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Гончарова Ю.И. и др. Изменение популяционной структуры населения Курской и Воронежской губерний в первой половине XX века. Изоляция расстоянием Малеко // *Генетика*. 2024. Т. 60. № 9. С. 90–97.
  18. Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Ефремова О.А. и др. Анализ уровня эндогамии популяции как основа популяционно-генетических и медико-генетических исследований // *Науч. результаты биомедицинских исследований*. 2021. Т. 7. № 4. С. 375–387. DOI: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-4
  19. Атраментова Л.А., Филиппова О.В. Пространственные характеристики брачной миграции в Белгородской популяции // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 5. С. 686–696. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V.* Spatial characteristics of marriage migration in the Belgorod population // *Rus. J. Genetics*. 2005. T. 41. № 5. С. 553–562).
  20. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М. и др. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 4. С. 513–522. doi: 10.7868/S0016675813040085 (*Kurbatova O.L., Pobedonostseva E.Y., Prudnikova A.S., et al.* Genetic demography of populations of three megalopolises in relation to the problem of creating genetic databases // *Rus. J. Genetics*. 2013. V. 49. № 4. P. 448–456.)  
doi: 10.1134/S102279541304008X
  21. Свежинский Е.А., Курбатова О.Л. Опыт исторической реконструкции генетико-демографической структуры московской популяции на рубеже XIX–XX веков // *Генетика*. 1999. Т. 35. № 8. С. 1149–1159. (*Svezhinsky E.A., Kurbatova O.L.* An attempt at the historical reconstruction of the genetic demographic structure of the moscow population at the turn of the 20th century // *Rus. J. Genetics*. 1999. V. 35. № 8. P. 988–998.)
  22. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2004. 431 с.
  23. Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Мухин В.Н., Осипенко С.Ю. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Этногеографические характеристики миграции в донецкой популяции // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 10. С. 1402–1408. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V., Osipenko S.Yu., Mukhin V.N.* Genetic demography of Ukrainian urban populations in the 1990s: ethnic geographic characteristics of migration in the Donetsk population // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 10. P. 1189–1195.)  
doi: 10.1023/A:1020609006063
  24. Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Осипенко С.Ю. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Этнический состав миграционного потока харьковской популяции // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 7. С. 972–979. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V., Osipenko S.Yu.* Genetic demography of Ukrainian urban populations in the 1990s: the ethnic composition of the migration flow in the Kharkov population // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 7. P. 816–823.)  
doi: 10.1023/A:1016399823573
  25. Атраментова Л.А., Филиппова О.В., Осипенко С.Ю. Генетико-демографические процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Национальность и место рождения мигрантов полтавской популяции // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 9. С. 1276–1281. (*Atramentova L.A., Filiptsova O.V., Osipenko S.Yu.* Genetic demography of Ukrainian urban populations in the 1990s: ethnicity and birthplaces of migrants to the Poltava population // *Rus. J. Genetics*. 2002. V. 38. № 9. P. 1082–1087.) doi: 10.1023/A:1020200100784
  26. Иванов В.П., Чурносоев М.И., Кириленко А.И. Популяционно-демографическая структура населения Курской области. Миграционные процессы // *Генетика*. 1997. Т. 33. № 3. С. 375–380. (*Ivanov V.P., Churnosov M.I., Kirilenko A.I.* Population demographic structure in Krupskaya oblast: migration // *Rus. J. Genetics*. 1997. V. 33. № 3. P. 300–305.)
  27. Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Биканов Р.А. и др. Изучение роли основных факторов популяционной динамики в механизме дифференциации и в формировании разнообразия и отягощенности наследственной патологии в субпопуляциях

- Карачаево-Черкесской республики // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 694–700. doi: 10.1134/S0016675819060213. (Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Bikanov R.A., et al. Study of the role of the main factors of population dynamics in the mechanism of differentiation and formation of diversity and genetic load of hereditary diseases in subpopulations of the karachay-cherkess republic // Rus. J. Genetics. 2019. V. 55. № 6. P. 738–743.) doi: 10.1134/S1022795419060206
28. Ельчинова Г.И., Парадеева Г.М., Ревазов А.А. и др. Медико-генетическое изучение населения Костромской области. Сообщение VI. Параметры изоляции расстоянием в популяциях Буйского и Шарьинского районов Костромской области // Генетика. 1988. Т. 24. № 7. С. 1276–1281.
  29. Мамедова Р.А. Влияние генетического дрейфа на территориальное распределение груза, а также спектр наследственных болезней в популяциях Кировской области: Автореф. дисс....канд. мед. наук. М., 1993. 23 с.
  30. Ельчинова Г.И. Опыт применения методов популяционно-генетического анализа при изучении популяций России с различной генетико-демографической структурой: Автореф. дисс....докт. биол. наук. М., 2001. 48 с.
  31. Мамедова Р.А., Ельчинова Г.И., Старцева Е.И. и др. Генетическая структура и груз наследственных болезней в пяти популяциях Архангельской области // Генетика. 1996. Т. 32. № 6. С. 837–841. (Mamedova R.A., El'chinova G.I., Startseva E.A., et al. Genetic structure and the load of hereditary diseases in five populations of Arkhangel'skaya oblast // Rus. J. Genetics. 1996. V. 32. № 6. P. 729–733.)
  32. Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Руденская Г.Е. и др. Комплексное популяционно- и медико-генетическое исследование населения двух районов Тверской области // Генетика. 2004. Т. 40. № 5. С. 667–676. doi: 10.1023/B:RUGE.0000029157.14539.10 (Zinchenko R.A., El'chinova G.I., Rudenskaia G.E., et al. Integrated population genetic and medical genetic study of two raions of the Tver oblast // Rus. J. Genetics. 2004. V. 40. № 5. P. 357–545.)
  33. Святова Г.С. Медико-генетическое последствие многолетних ядерных испытаний на Семипалатинском полигоне: Автореф. дисс....докт. мед. наук. М., 2002. 48 с.
  34. Ельчинова Г.И., Осипова Е.В., Зинченко Р.А. и др. Брачно-миграционная характеристика городского и сельского населения Удмуртии // Генетика. 2006. Т. 42. № 4. С. 566–570. (El'chinova G.I., Zinchenko R.A., Gavrilina S.G., et al. Marriage-migration characteristics of the urban and rural populations of Udmurtia // Rus. J. Genetics. 2006. V. 42. № 4. P. 454–458.) doi: 10.1134/S1022795406040132
  35. Ельчинова Г.И., Осипова Е.В., Зинченко Р.А. Генетико-эпидемиологические исследования в Удмуртской республике: брачно-миграционные параметры городского и сельского населения // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. 2011. № 1. С. 45–50.
  36. Ельчинова Г.И., Макаов А.Х.-М., Ревазова Ю.А. и др. Брачно-миграционная характеристика черкесов (конец XX века) // Генетика. 2016. Т. 52. № 3. С. 385–388. doi: 10.7868/S0016675816030061. (El'chinova G.I., Gavrilina S.G., Rusakova A.V., et al. Marriage and migratory characteristic of circassians (late 20th century) // Rus. J. Genetics. 2016. V. 52. № 3. P. 339–341.) doi: 10.1134/S1022795416030066
  37. Ельчинова Г.И., Кадышев В.В., Зинченко Р.А. Изоляция расстоянием у северных осетин // Генетика. 2021. Т. 57. № 3. С. 358–360. doi: 10.31857/S0016675821030073 (El'chinova G.I., Kadyshchev V.V., Zinchenko R.A. Isolation by distance in north ossetians // Rus. J. Genetics. 2021. V. 57. № 3. P. 371–373.) doi: 10.1134/S1022795421030078
  38. Ельчинова Г.И., Гетоева З.К., Кадышев В.В. и др. Популяционно-генетические параметры северо-осетинских кумыков // Мед. генетика. 2022. Т. 21 (5). С. 42–45. doi: 10.25557/2073-7998.2022.05.42-45.
  39. Ельчинова Г.И., Шакманов М.М., Ревазова Ю.А. и др. Брачно-миграционная характеристика карачаевцев // Генетика. 2015. Т. 51. № 8. С. 941–945. doi: 10.7868/S0016675815070036 (El'chinova G.I., Shakmanov M.M., Revazova Yu.A., et al. Ethnic marriage assortativeness and intensity of metisation of Karachays // Rus. J. Genetics. 2015. V. 51. № 8. P. 807–811)
  40. Ельчинова Г.И., Ревазова Ю.А., Макаов А.Х.-М., Зинченко Р.А. Популяционно-генетическая характеристика ногайцев Карачаево-Черкесии (по данным о распределении фамилий и брачных миграциях) // Вестн. МГУ. Серия 23: Антропология. 2016. № 1. С. 109–115.
  41. Ельчинова Г.И., Симонов Ю.И., Вафина З.И., Зинченко Р.А. Эндогамия и изоляция расстоянием в населении Татарстана // Генетика. 2011. Т. 47. № 8. С. 1126–1130. (El'chinova G.I., Simonov Y.I., Zinchenko R.A., Vafina Z.I. Endogamy and isolation by distance in the Tatarstan population // Rus. J. Genetics. 2011. V. 47. № 8. P. 999–1003.) doi: 10.1134/S1022795411080059
  42. Ельчинова Г.И., Хидиятова И.М., Тереховская И.Г. и др. Брачно-миграционные параметры населения шести сельских районов Республики Башкортостан // Генетика. 2009. Т. 45. № 3. С. 412–419. (El'chinova G.I., Terekhovskaya I.G., Zinchenko R.A., et al. Marriage migration parameters in six rural districts of Bashkortostan republic // Rus. J. Genetics. 2009. V. 45. № 3. P. 362–369.) doi: 10.1134/S1022795409030168

43. Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Безменова И.Н. и др. Популяционно-генетические характеристики и генетико-эпидемиологическое исследование ассоциаций генов-кандидатов с мультифакториальными заболеваниями // Науч. результаты биомед. исследований. 2018. Т. 4. № 4. С. 20–30. doi: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-3
44. Sirotnina S., Ponomarenko I., Kharchenko A. et al. Novel polymorphism in the promoter of the CYP4A11 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease // Dis. Markers. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5812802>
45. Пасенов К.Н. Особенности ассоциаций SHBG-связанных генов с раком молочной железы у женщин в зависимости от наличия наследственной отягощенности и мутаций в генах BRCA1/CHEK2 // Науч. результаты биомед. исследований. 2024. Т. 10. № 1. С. 69–88. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-1-0-4
46. Polonikov A., Kharchenko A., Bykanova M. et al. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population // Gene. 2017. V. 627. P. 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004>
47. Reshetnikov E., Ponomarenko I., Golovchenko O. et al. The VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and blood pressure in women at the end of pregnancy // Taiwan. J. Obstet. Gynecol. 2019. V. 58. P. 390–395. doi:10.1016/j.tjog.2018.11.035.
48. Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // Int. J. Ophthalmol. 2017. V. 10. № 10. P. 1490–1494. doi:10.18240/ijo.2017.10.02
49. Кочетова О.В., Авзалетдинова Д.Ш., Корытина Г.Ф. и др. Анализ полиморфных вариантов генов рецепторов серотонина и гамма-аминомасляной кислоты у больных сахарным диабетом 2 типа // Науч. результаты биомед. исследований. 2023. Т. 9. № 3. С. 322–332. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-3-0-3
50. Golovchenko I., Aizikovich B., Golovchenko O. et al. Sex hormone candidate gene polymorphisms are associated with endometriosis // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 8. № 23(22). doi: 10.3390/ijms232213691.
51. Novakov V., Novakova O., Churnosova M. Intergenic interactions of SBNO1, NFAT5 and GLT8D1 determine the susceptibility to knee osteoarthritis among Europeans of Russia // Life. 2023. № 13. P. 405. doi.org/10.3390/life13020405.

## Dynamics of the Population Structure of Belgorod Oblast. Malecot's Isolation by Distance

K. N. Sergeeva<sup>1</sup>, S. N. Sokorev<sup>1</sup>, Y. I. Goncharova<sup>1</sup>, A. S. Nevinnykh<sup>1</sup>,  
I. V. Batlutskaya<sup>1</sup>, I. N. Sorokina<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

\*e-mail: Sorokina\_5@mail.ru

The article presents the results of assessing the dynamics of parameters of the Maleko distance model of isolation among the population of the Belgorod region from 1978–1980 for 2016–2018. When compared with data for 1890–1910 and 1951–1953 on average for the region an increase in the root-mean-square distances between the places of birth of spouses was established, taking into account long-distance migrations (6.9 times) and without them (13.3 times), effective migration pressure (1.5 times) and a decrease in the coefficient of linear systematic pressure (11 times), the effective population size (1.3 times). The level of local inbreeding decreased significantly among the urban population and remained unchanged among the rural population. The most pronounced changes in the parameters of the isolation model by Malecot's distance occurred in the middle – second half of the twentieth century. The differences in most indicators of the model of isolation by the Malecot's distance between city and village, maximally expressed at the end of the 19th century, decreased over the course of generations and were practically leveled out by 2016–2018.

**Keywords:** Malecot's model of isolation by distance, local inbreeding.

УДК: 575.22: 599.323.4

## ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ У ВОСТОЧНОАЗИАТСКОЙ МЫШИ НА ЮГЕ СИХОТЭ-АЛИНЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b*

© 2024 г. В. Д. Цуканова<sup>1</sup>, И. Н. Шереметьева<sup>1, \*</sup>

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

\*e-mail: sheremet76@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 19.03.2024 г.

Проведен анализ изменчивости гена цитохрома *b* 11 особей восточноазиатских мышей из Уссурийского заповедника, расположенного на южных отрогах Сихотэ-Алиня в горах Пржевальского. В анализируемой популяции отмечен относительно высокий уровень генетического разнообразия за счет обнаружения особей с гаплотипами трех филогенетических линий: “Amur”, “Korea” и “Manchuria”. Большая часть особей (72.73%) в популяции имела “Amur”-гаплотипы. Отмечено, что частота особей с гаплотипами “Korea” в Уссурийском заповеднике (9.09%) значительно ниже, чем в проанализированной нами ранее популяции на самом юге Приморского края, в Хасанском районе (38.46%). В Уссурийском заповеднике впервые для территории Дальнего Востока России обнаружены две особи с гаплотипами “Manchuria”. Ранее в литературе была отмечена только одна находка особи с подобным гаплотипом в провинции Хэйлунцзян северо-востока Китая. Нами высказано предположение, что особи с гаплотипами “Korea” проникают на юг Сихотэ-Алиня из Южной Кореи, а с гаплотипами “Manchuria” — из Северо-Восточного Китая.

**Ключевые слова:** внутривидовая изменчивость, филогеография, цитохром *b* мтДНК, восточноазиатская мышь *Apodemus peninsulae*.

DOI: 10.31857/S0016675824090128 EDN: ADIPIJ

Восточноазиатская мышь *Apodemus peninsulae* Thomas, 1906 — типичный представитель лесной фауны на юге Дальнего Востока России. Являясь обитателем смешанных и широколиственных лесов, вид распространен от тихоокеанского побережья на востоке, включая острова Русский и Стенькина в зал. Петра Великого (Японское море), о-в Сахалин, о-в Хоккайдо (Япония), до Центральной и Южной Сибири (правобережье р. Оби) на западе. По побережью и долинам рек глубоко проникает на север вплоть до Полярного круга. Филогеография этого очень многочисленного и широко распространенного вида ранее изучалась в ряде исследований, в результате которых было показано, что на севере ареала (северо-восток Китая, Корея, Монголия, Япония и Россия) присутствуют три филогенетические линии [1–4]. Две из них имеют широкое распространение, а третья обнаружена только у одной особи из провинции Хэйлунцзян в северо-восточной части Китая [2]. При этом на территории юга Дальнего Востока России была обнаружена только одна из широко распространенных линий, названная нами “Amur” (ранее

“Primorye”) [4]. Следует отметить, что при этом было проанализировано 59 экз. с Дальнего Востока России (32 экз. с островов и 27 — с материка с малым размером выборки). Проведенный анализ восточноазиатских мышей из девяти локальных выборок с юга Корейского п-ова не только подтвердил данные предыдущих исследований [2] о более тесной связи с особями восточнокитайских или сибирских популяций, нежели с дальневосточными популяциями, но и показал отсутствие генетического обмена с соседними популяциями [5]. В дальнейшем при проведении анализа изменчивости участка гена цитохрома *b* у восточноазиатской мыши *A. peninsulae* из популяции Национального парка “Земля леопарда” на самом юге Приморского края нами впервые были обнаружены гаплотипы филогенетической линии “Korea” [6] с достаточно высокой частотой (38.46% — пять из 13 особей).

Таким образом, стало понятно, что распространение особей, имеющих гаплотипы филогенетической линии “Korea”, не ограничивается Корейским п-овом, как считали корейские авторы [5], а исследование небольшого числа очень малочисленных

выборки явно недостаточно для понимания филогенетической структуры восточноазиатской мыши на столь обширной и географически сложной территории. Таким образом, для выявления полной картины генетического разнообразия вида необходимо увеличение не только географии выборок, но и их объема.

Цель настоящего исследования — на примере выборки из популяции Уссурийского заповедника как района экологического оптимума для восточноазиатской мыши охарактеризовать генетическое разнообразие на основе анализа изменчивости гена цитохрома *b*.

В настоящей работе проанализирована изменчивость гена цитохрома *b* у 11 экземпляров восточноазиатских мышей из Уссурийского заповедника, расположенного на южных отрогах Сихотэ-Алиня в горах Пржевальского. Образцы тканей взяты из коллекции УНУ “Биоресурсная коллекция ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН” (г. Владивосток).

ДНК выделяли методом солевой экстракции [7] из фиксированных в спирте тканей мышц. Схемы амплификации и использованные праймеры для получения фрагмента и подготовки проб к секвенированию были описаны ранее [4]. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 (Applied Biosystems, США) на базе ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток). Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.2.5.0 [8], а построение филогенетических деревьев выполнено в программе MEGA X [9]. При построении деревьев в анализ включены 38 нуклеотидных последовательностей, полученных ранее и помещенных в GenBank (NCBI) под номерами AB073788, AB073790, AB073791, AB073794–AB073798, AB073800–AB073805, AB073808, AB073810 [1], AF427335–AF427338 (Деконенко, Иванов не опуб.), JQ664596, JQ664597 [3], AY388999–AY389000, AY389002 [10], AM945780, AM945797 [2], MG748177, MG748179, MG748193, MG748201, MG748239 [11], KT364353, KT364362, KT364369, KT364378, KT364379 [5].

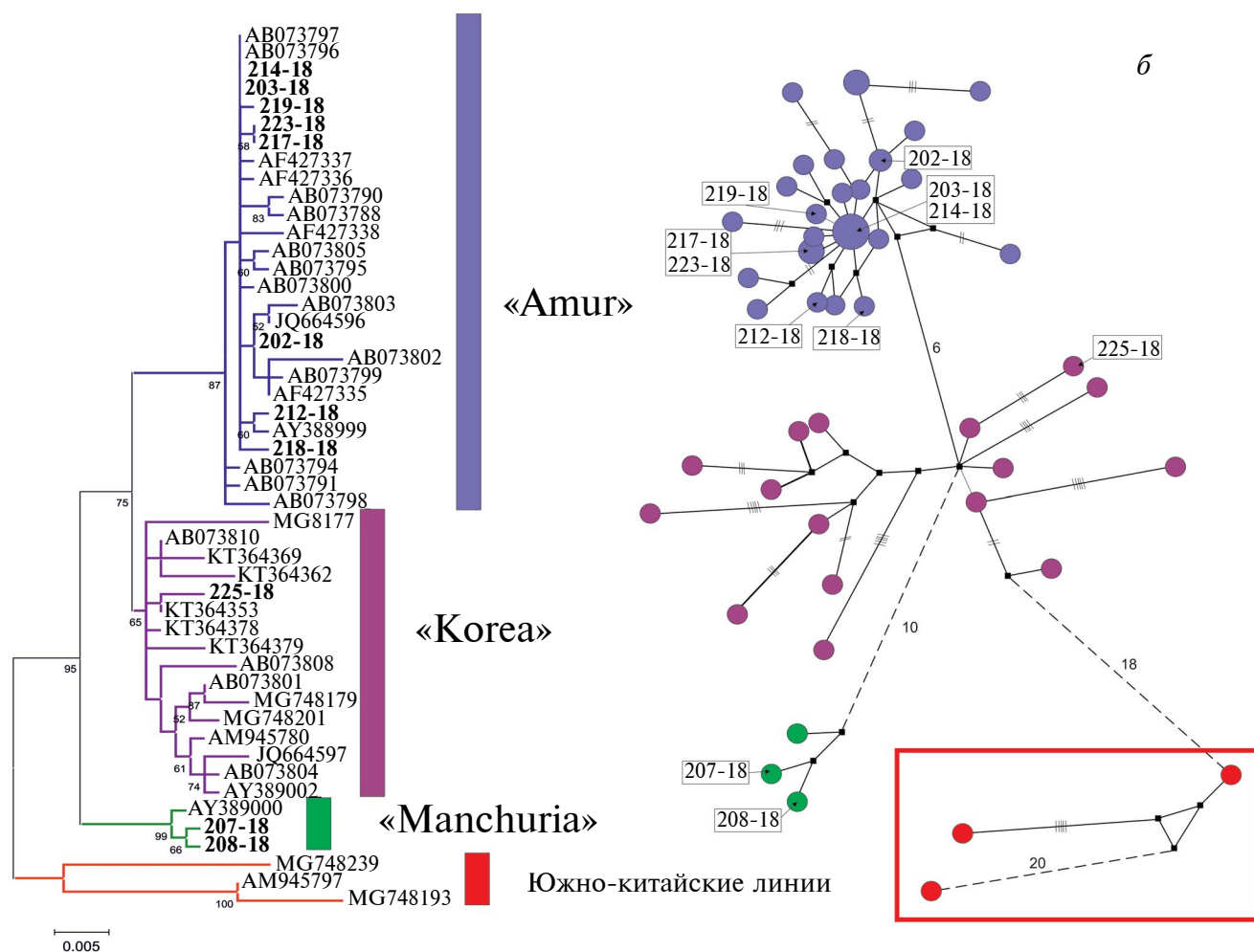
Для построения деревьев применяли метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием эволюционной модели НКУ+I (модель Хасегава–Кишино–Яно) [12] со значением эволюционной нейтральности сайтов, равным 0.80, и максимальным логарифмом правдоподобия — 1875.064. Выбор эволюционной модели ML-анализа определяли по результатам модель-теста в программе MEGA X [9], по которым для модели НКУ+I были получены минимальные значения байесовского информационного критерия (BIC = 4800.783). В качестве внешней группы использованы гаплотипы южных филогенетических

линий вида (AM945797, MG748193 и MG748239), обнаруженные только у особей провинции Сычуань (Китай). Достоверность кластеризации оценивали с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей). Сети гаплотипов построены при помощи программы Network 10.0.0.0 с использованием метода «Median-Joining» [13].

Для всех 11 новых образцов восточноазиатской мыши были получены последовательности длиной от 746 до 1476 пн, включающие участки гена цитохрома *b* и контрольного региона мтДНК, все они внесены в GenBank (NCBI) под номерами PP488384–PP488394. После выравнивания с гомологичными последовательностями из GenBank (NCBI) полученные последовательности участка гена цитохрома *b* были обрезаны до длины 744 пн. Всего обнаружено девять гаплотипов, из которых восемь были обнаружены впервые. Они содержали 28 переменных сайтов (3.76%), среди которых 18 были информативными. Из обнаруженных гаплотипов два были встречены у двух особей, а остальные семь (77.78%) были уникальными (встречены только у одной особи). Среднее число нуклеотидных различий между гаплотипами составило 8.58. Гаплотипическое разнообразие для выборки равно  $0.964 \pm 0.051$ , а нуклеотидное —  $0.01153 \pm 0.00309$ , что больше, чем было выявлено раньше для Дальнего Востока России ( $0.942 \pm 0.048$  и  $0.00636 \pm 0.00105$  соответственно) [2] и Южной Кореи ( $0.98 \pm 0.01$  и  $0.00844 \pm 0.00042$  соответственно) [5].

Все новые последовательности на ML-дендрограмме были распределены на три клады, которые соответствуют линиям “Amur”, “Korea” и “Manchuria” (рис. 1, а). Линии “Amur” и “Korea” на дереве сестринские, а линия “Manchuria” расположена базальнее, что указывает на ее большую древность. Большая часть последовательностей (72.73%) попала в кладу “Amur”, одна последовательность (9.09%) — в кладу “Korea”. Стоит отметить, что частота встречаемости особей с гаплотипами “Korea” на самом юге Приморского края в Хасанском районе несколько выше и составляет 38.46% [6]. Два гаплотипа 207-18 и 208-18 сгруппировались вместе с гаплотипом, обнаруженным ранее у особи из провинции Хэйлунцзян северо-востока Китая [2], сформировав кладу “Manchuria”.

С целью проведения более точной кластеризации гаплотипов восточноазиатской мыши была построена медианная сеть (рис. 1, б). В целом сеть подтверждает данные, полученные при ML-анализе, показывая разделение всех вновь исследованных гаплотипов на три линии. Линия “Amur” имела структуру, близкую к звездообразной, формирование которой, как правило, объясняют быстрой экспансией после сокращения численности (“бутылочного горлышка”). Центральный гаплотип этой линии был обнаружен у двух особей (203-18 и



**Рис. 1.** ML-дендрограмма (а) и филогенетическая сеть гаплотипов цитохрома *b* мтДНК (б) восточноазиатской мыши. В узлах ветвления указаны бутстреп-поддержки, рассчитанные для 1000 повторов. Номера образцов из Уссурийского заповедника обозначены на дереве жирным шрифтом. Размеры кружков пропорциональны количеству образцов с данным гаплотипом. Цифры и риски на ветвях сети соответствуют числу нуклеотидных замен больше двух.

214-18), а все остальные отличались от него на 1–2 нуклеотидные замены.

Линия “Korea” генетически более разнообразна, чем линия “Amur”. Ранее было показано, что внутри этой линии выделяются две подгруппы, которые приурочены к различным географическим регионам [4, 5]. Первая – к Корейскому п-ову, а вторая – к Монголии, Алтаю и Забайкалью. Гаплотип 225-18, обнаруженный в Уссурийском заповеднике, оказался наиболее близок к гаплотипу KT364353 из Южной Кореи (пос. Джинбу в уезде Пхенчхан в провинции Канвондо), отличающийся от него тремя транзигциями. Учитывая тесную связь гаплотипов из Уссурийского заповедника и Южной Кореи, а также снижение частоты встречаемости особей с гаплотипами этой линии от южных (Хасанский р-н) к центральным (Уссурийский

заповедник) районам Приморского края, можно предположить, что происходит расширение линии “Korea” и проникновение ее на север.

Гаплотипы особей, попавшие в кладу “Manchuria” (207-18 и 208-18), отличаются от гаплотипа особи из провинции Хэйлунцзян северо-востока Китая по трем заменам, а друг от друга по двум. Можно предположить, что особи с гаплотипами “Manchuria” проникают на территорию Уссурийского заповедника с северо-востока Китая. Тогда следует ожидать, что частота встречаемости особей с гаплотипами этой группы в западных районах Приморского края должна быть выше. Однако на сегодняшний момент это невозможно оценить, поскольку восточноазиатская мышь из этих районов остается неисследованной.

В результате проведенной работы были получены новые данные по изменчивости участка гена цитохрома *b* мтДНК восточноазиатской мыши *A. peninsulae* в Уссурийском заповеднике, расположенном на южных отрогах Сихотэ-Алиня в горах Пржевальского. Впервые показано обитание в этом районе особей с гаплотипами трех филогенетических линий “Amur”, “Korea” и “Manchuria”. При этом если филогенетическая линия “Korea” раньше уже отмечалась нами на территории края, то линия “Manchuria” обнаружена впервые. Высказано предположение, что особи с гаплотипами филогруппы “Korea” проникают на юг Сихотэ-Алиня из Южной Кореи, а с гаплотипами филогруппы “Manchuria” — из Северо-Восточного Китая.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00158, <https://rscf.ru/project/24-24-00158/>

Исследование одобрено Этическим комитетом ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (21 февраля 2023 г., протокол № 1).

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. Serizawa K., Suzuki H., Iwasa M. et al. A spatial aspect on mitochondrial DNA genealogy in *Apodemus peninsulae* from East Asia // *Biochem. Genet.* 2002. № 40. P. 149–161. doi 10.1023/a:1015841424598
2. Sakka H., Quere J.P., Kartavtseva I.V. et al. Comparative phylogeography of four *Apodemus* species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: Evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure // *Biol. J. Linnean Society.* 2010. V. 100. P. 797–821. doi 10.1111/j.1095-8312.2010.01477.x
3. Bayarlkhaagva D., Tumendemberel O., Damdin B. Mitochondrial cytochrome b gene study of *Apodemus peninsulae* in Mongolia // *Int. J. Curr. Res.* 2013. V. 5. № 12. P. 3892–3896. doi 10.13140/RG.2.2.24365.31200
4. Шереметьева И.Н., Цуканова В.Д., Тимофеева Д.М. и др. Новые данные по распределению основных филогенетических линий восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* на востоке России // Региональные проблемы. 2020. Т. 23. № 3. С. 10–20. doi 10.31433/2618-9593-2020-23-3-10-20
5. Kim H.R., Park Y.C. Genetic isolation of Korean populations of *Apodemus peninsulae* (Rodentia: Muridae) from their neighboring populations // *Genes & Genomics.* 2015. V. 37. № 12. P. 999–1005. doi 10.1007/s13258-015-0331-0
6. Цуканова В.Д., Шереметьева И.Н., Малыгин В.М. Изменчивость гена *cyt b* у восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* Thomas, 1906 — природного носителя хантавируса AMRV в Хасанском районе Приморского края // *Амурский зоол. журн.* 2024. № 1. С. 56–64. <https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-1-56-64>
7. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCRbased techniques // *Nucl. Aci. Res.* 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
8. Hall T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 // *Nucl. Aci. Symp. Series.* 1999. V. 41. № 41. P. 95–98. doi 10.1021/bk-1999-0734.ch008
9. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549. doi 10.1093/molbev/msy096
10. Liu X., Wei F., Li M. et al. Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with emphasis on Chinese species // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004. V. 33. № 1. P. 1–15. doi 10.1016/j.ympev.2004.05.011
11. Liu S.Y., He K., Chen S.D. et al. How many species of *Apodemus* and *Rattus* occur in China? A survey based on mitochondrial *cyt b* and morphological analyses // *Zool. Res.* 2018. V. 39. № 5. P. 309–320. doi 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.053
12. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1985. № 22. P. 160–174. doi 10.1007/BF02101694
13. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

## Detection of New Phylogenetic Lineages in the Korean Field Mouse in the South of Sikhote-Alin Based on Analysis of the Cytochrome *b* Gene Variability

V. D. Tsukanova<sup>1</sup>, I. N. Sheremetyeva<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> *Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch Russia Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

*\*e-mail: sheremet76@yandex.ru*

The variability of the cytochrome *b* gene in 11 individuals of Korean field mouse from the Ussuri Nature Reserve, located on the southern spurs of the Sikhote-Alin in the Przewalski Mountains, was analyzed. In the population, a high level of genetic diversity was identified due to the discovery of individuals with haplotypes of three phylogenetic lineages “Amur”, “Korea” and “Manchuria”. The majority of individuals (72.73%) in the population had “Amur” haplotypes. A significantly lower frequency of occurrence of individuals with “Korea” haplotypes in the Ussuri Nature Reserve (9.09%) compared to the previously analyzed population of the Khasansky District (38.46%) located in the very south of the Primorsky Krai was noted. In the Ussuri Nature Reserve, for the first time in the Russian Far East, two individuals with “Manchuria” haplotypes were discovered. Previously, only one finding of an individual with a similar haplotype was noted in the literature in the Heilongjiang province of Northeast China. It has been suggested that individuals with haplotypes of the “Korea” phylogroup penetrate into the south of Sikhote-Alin from South Korea, and with haplotypes of the “Manchuria” phylogroup from Northeast China.

**Keywords:** intraspecific variability, phylogeography, mtDNA cytochrome *b*, Korean field mouse *Apodemus peninsulae*.