

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2023 • 27 • 5



Генетика растений / Селекция растений на иммунитет и продуктивность / Генетика животных /
Генетика человека / Медицинская генетика / Моделирование патологий

vavilov.ejrbu.ru
vavilov-journal@biopet.nsc.ru
vavilov-journal@biopet.nsc.ru
Индекс издания 42153



Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJGB-23-51

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

А.В. Кочетов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)

Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)

С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)

П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)

И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)

Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)

С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)

И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)

Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)

В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)

В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)

М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)

Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)

Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)

В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)

В.А. Степанов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)

Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)

Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)

С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Online edition

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJGB-23-51

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief*A.V. Kochetov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.A. Beshpalova*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*N.P. Bondar*, Cand. Sci. (Biology), Russia*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A. Börner*, Dr. Sci., Germany*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus*S.V. Kostrov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*A.M. Kudryavtsev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*I.N. Lavrik*, Dr. Sci. (Biology), Germany*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.R. Mursalimov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States*A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia*E.Y. Rykova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*Y.N. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia*R.I. Sheiko*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Agricul.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.A. Stepanov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*N.K. Yankovsky*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Генетика растений

433

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Идентификация новых нуклеотидных последовательностей гена *Glu-B1-1*, кодирующего глютеины х-типа у мягкой пшеницы. А.А. Галимова, Б.Р. Кулуев

440

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Аллельные варианты 5'-UTR и экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* у инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. российской селекции. Д.Х. Архестова, Б.Р. Шомахов, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

447

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Устойчивость проростков и взрослых растений к бурой ржавчине у некоторых линий болгарской мягкой пшеницы. В. Иванова (на англ. языке)

454

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Комплексная агробиологическая оценка и анализ генетических взаимосвязей перспективных сортов ореха грецкого Никитского ботанического сада. Ю.В. Плугатарь, И.И. Супрун, С.Ю. Хохлов, И.В. Степанов, Е.А. Аль-Накиб

Генетика животных

463

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Гены-кандидаты доместикации и устойчивости к холоду по данным полногеномного секвенирования российских пород крупного рогатого скота и овец. Н.С. Юдин, Д.М. Ларкин

471

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Идентификация гомозиготных обогащенных участков в геноме голштинов. М.Г. Смарагдов (на англ. языке)

480

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Самки мышей CD-1 распознают репродуктивно успешных самцов по летучим органическим соединениям их мочи. А.С. Хоцкина, Е.Л. Завьялов, Е.П. Шнайдер, Л.А. Герлинская, С.О. Масленникова, Д.В. Петровский, М.Н. Балдин, А.Л. Макасы, В.М. Грузнов, М.Л. Трошков, М.П. Мошкин (на англ. языке)

488

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Дифференциация *Bos grunniens* и *Bos taurus* на основании полиморфизма STR-локусов.

К.Б. Чекиров, Ж.Т. Исакова, В.Н. Кипень, М.И. Ирсадиев, С.Б. Мукеева, К.А. Айтбаев, Г.А. Шаршеналиева, С.Б. Бейшеналиева, Б.У. Кыдыралиева

Генетика человека

495

ОБЗОР

Количественные параметры генома человека при старении. В.П. Волобаев,

С.С. Кунижева, Л.И. Уральский, Д.А. Куприянова, Е.И. Розаев

502

ОБЗОР

Мозаичная потеря Y-хромосомы при нейродегенеративных и онкологических заболеваниях человека. И.Л. Кузнецова, Л.И. Уральский,

Т.В. Тяжелова, Т.В. Андреева, Е.И. Розаев

Медицинская генетика

512

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Роль генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов в развитии хронической обструктивной болезни легких. Г.Ф. Корытина, Л.З. Ахмадишина, В.А. Маркелов, Ю.Г. Азнабаева, О.В. Кочетова, Т.Р. Насибуллин, А.П. Ларкина, Н.Н. Хуснутдинова, Н.Ш. Загидуллин, Т.В. Викторова

522

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, методами полногеномного секвенирования и машинного обучения. Д.Е. Иванощук, А.Б. Колкер, О.В. Тимощенко, С.Е. Семаев, Е.В. Шахтинейдер

Моделирование патологий

530

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Метаболомный профиль сыворотки крови при экспериментальной артериальной гипертензии.

А.А. Серяпина, А.А. Малякко, Ю.К. Политыко, Л.В. Яньшолле, Ю.П. Центалович, А.Л. Маркель

Plant genetics

433 ORIGINAL ARTICLE
Identification of new nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene encoding α -type glutenins in bread wheat. A.A. Galimova, B.R. Kuluev

440 ORIGINAL ARTICLE
5'-UTR allelic variants and expression of the lycopene- ϵ -cyclase *LCYE* gene in maize (*Zea mays* L.) inbred lines of Russian selection. D.Kh. Arkhestova, B.R. Shomakhov, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva

Plant breeding for immunity and performance

447 ORIGINAL ARTICLE
Seedling and adult plant resistance to leaf rust in some Bulgarian common wheat lines. V. Ivanova

454 ORIGINAL ARTICLE
Comprehensive agrobiological assessment and analysis of genetic relationships of promising walnut varieties of the Nikitsky Botanical Gardens. Yu.V. Plugatar, I.I. Suprun, S.Yu. Khokhlov, I.V. Stepanov, E.A. Al-Nakib

Animal genetics

463 ORIGINAL ARTICLE
Candidate genes for domestication and resistance to cold climate according to whole genome sequencing data of Russian cattle and sheep breeds. N.S. Yudin, D.M. Larkin

471 ORIGINAL ARTICLE
Identification of homozygosity-rich regions in the Holstein genome. M.G. Smaragdov

480 ORIGINAL ARTICLE
CD-1 mice females recognize male reproductive success via volatile organic compounds in urine. A.S. Khotskina, E.L. Zavjalov, E.P. Shnyder, L.A. Gerlinskaya, S.O. Maslennikova, D.V. Petrovskii, M.N. Baldin, A.L. Makas, V.M. Gruznov, M.L. Troshkov, M.P. Moshkin

488 ORIGINAL ARTICLE
Differentiation of *Bos grunniens* and *Bos taurus* based on STR locus polymorphism. K.B. Chekirov, Zh.T. Isakova, V.N. Kipen, M.I. Irsaliev, S.B. Mukeeva, K.A. Aitbaev, G.A. Sharshenalieva, S.B. Beyshenalieva, B.U. Kydyralieva

Human genetics

495 REVIEW
Quantifying human genome parameters in aging. V.P. Volobaev, S.S. Kunizheva, L.I. Uralsky, D.A. Kupriyanova, E.I. Rogaev

502 REVIEW
Mosaic loss of the Y chromosome in human neurodegenerative and oncological diseases. I.L. Kuznetsova, L.I. Uralsky, T.V. Tyazhelova, T.V. Andreeva, E.I. Rogaev

Medical genetics

512 ORIGINAL ARTICLE
Role of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and sirtuin genes in chronic obstructive pulmonary disease development. G.F. Korytina, L.Z. Akhmadishina, V.A. Markelov, Y.G. Aznabaeva, O.V. Kochetova, T.R. Nasibullin, A.P. Larkina, N.N. Khusnutdinova, N.Sh. Zagidullin, T.V. Victorova

522 ORIGINAL ARTICLE
Searching for new genes associated with the familial hypercholesterolemia phenotype using whole-genome sequencing and machine learning. D.E. Ivanoshchuk, A.B. Kolker, O.V. Timoshchenko, S.E. Semaev, E.V. Shakhtshneider

Modeling of disorders

530 ORIGINAL ARTICLE
Metabolic profile of blood serum in experimental arterial hypertension. A.A. Seryapina, A.A. Malyavko, Yu.K. Polityko, L.V. Yanshole, Yu.P. Tsentelovich, A.L. Markel

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Идентификация новых нуклеотидных последовательностей гена *Glu-B1-1*, кодирующего глютенины х-типа у мягкой пшеницы

А.А. Галимова^{1, 2} , Б.Р. Кулуев^{1, 2}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

 aiz.galimova@yandex.ru

Аннотация. Мягкая пшеница, наряду с другими представителями трибы Пшеницевых, обладает огромным генетическим потенциалом для создания сортов с высокими технологическими и реологическими свойствами муки. Поэтому исследования генетической базы полиморфизма сортов мягкой пшеницы и выявление аллелей генов, ассоциированных с высокими хлебопекарными признаками, представляются актуальными. Цель данной работы – анализ нуклеотидных последовательностей гена субъединиц х-типа высокомолекулярных глютенинов *Glu-B1-1* и анализ предсказанных аминокислотных последовательностей его белкового продукта у трех генотипов мягкой пшеницы. В ходе генотипирования по гену *Glu-B1-1* у сортов мягкой пшеницы Авеста, Ленинградка крупнозерная и линии С-75094 были обнаружены ранее не описанные изменения в размерах амплифицируемых участков. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей этих генов с известными опубликованными последовательностями показал наличие двух делеций у генотипов Авеста и С-75094 и семи однонуклеотидных замен у сорта Ленинградка крупнозерная. Выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей *Glu-B1* рассматриваемых генотипов и стандартного сорта, несущего аллель *Glu-B1-a*, показало, что делеции в аминокислотных последовательностях у сорта Авеста и линии С-75094 локализируются в центральном домене белка и влияют на количество три-, гекса- и нонапептидов. У сорта Ленинградка крупнозерная было выявлено уменьшение количества трипептида GQQ и гексапептида PGQGQQ на одну единицу; кроме того, выявлены замены пяти аминокислот. Таким образом, нами обнаружены ранее не описанные делеции и замены в нуклеотидных последовательностях гена высокомолекулярных глютенинов *Glu-B1-1*, которые приводят к изменениям аминокислотных последовательностей в функционально значимых участках, а именно в центральных доменах белковых молекул. Выявленные мутации могут быть использованы при генотипировании сортообразцов мягкой пшеницы.

Ключевые слова: хлебопекарные качества; высокомолекулярные субъединицы глютенина; гены *Glu-1*; генотипирование.


Для цитирования: Галимова А.А., Кулуев Б.Р. Идентификация новых нуклеотидных последовательностей гена *Glu-B1-1*, кодирующего глютенины х-типа у мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):433-439. DOI 10.18699/VJGB-23-52

Identification of new nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene encoding x-type glutenins in bread wheat

A.A. Galimova^{1, 2} , B.R. Kuluev^{1, 2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

 aiz.galimova@yandex.ru

Abstract. Studies of the genetic base and polymorphism of bread wheat cultivars aimed at identifying alleles of genes associated with high baking and other economically valuable traits seem to be relevant, since bread wheat, along with all representatives of the Triticeae tribe, has a huge genetic potential for creating cultivars with high technological and rheological properties of grain flour. The aim of this study was sequencing and analysis of the nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene, and analysis of the predicted amino acid sequences of its protein product in three cultivars of bread wheat. Thus, in the course of genotyping cultivars and lines of bread wheat for the *Glu-B1-1* gene, in the cultivars 'Avesta', 'Leningradka krupnozernaya' and line C-75094, previously undescribed changes in the size of amplifiable regions of the *Glu-B1-1* gene for high-molecular-weight glutenins were found.

Comparative analysis of the nucleotide sequences of these genes with known sequences showed the presence of two deletions in 'Avesta' and C-75094 and the presence of seven single-nucleotide substitutions in 'Leningradka krupnozernaya'. Alignment of the predicted *Glu-B1* amino acid sequences of the studied accessions and the standard cultivar carrying the *Glu-B1-a* allele showed that deletions in the amino acid sequences of 'Avesta' and C-75094 accessions are localized in the central domain of the protein and affect the amount of tri-, hexa-, and nonapeptides, and in 'Leningradka krupnozernaya', a decrease in GQQ and PGQGQQ by one unit was revealed. In addition, substitutions of five amino acids were found in 'Leningradka krupnozernaya'. Thus, we have found previously undescribed deletions and substitutions in the nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene for high-molecular-weight glutenins, which lead to changes in amino acid sequences in functionally important regions, namely, in the central domains of protein molecules. The identified mutations can be used for genotyping bread wheat cultivars.

Key words: baking quality; high-molecular-weight glutenin subunits; *Glu-1* genes; genotyping.

For citation: Galimova A.A., Kuluev B.R. Identification of new nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene encoding x-type glutenins in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):433-439. DOI 10.18699/VJGB-23-52

Введение

Высокомолекулярные субъединицы глютенина (ВМСГ) играют важную роль в определении вязкоупругих свойств зерна мягкой пшеницы, поскольку они способствуют образованию более крупных полимеров клейковины и являются основными детерминантами эластичности теста (Shewry et al., 1989, 1992, 1995, 1997). Поэтому характеристика состава ВМСГ – важная задача в программах селекции мягкой пшеницы, направленных на улучшение качества зерна. Это дает возможность прогнозирования хлебопекарных качеств сортов мягкой пшеницы (Rayne, 1987; Nucia et al., 2019).

До недавнего времени основным методом определения состава ВМСГ был SDS-электрофорез запасных белков, на основе которого выявлено огромное аллельное разнообразие ВМСГ в трибе Пшеницевых. К примеру, для локуса *Glu-A1* субгена А на сегодняшний день установлено 52 аллеля, для локуса *Glu-B1* субгена В – 83 аллеля, для локуса *Glu-D1* субгена D – 70 аллелей (McIntosh et al., 2013).

В последние годы на смену SDS-электрофорезу белков приходят методы молекулярной генетики, которые позволяют различить субъединицы высокомолекулярных глютенинов со схожими молекулярными массами на генетическом уровне (Vafin et al., 2018; Nucia et al., 2019). Однако нуклеотидные последовательности большинства аллелей ВМСГ, определенных с помощью белковых электрофореграмм, до сих пор не охарактеризованы и не депонированы в базах данных. Исследования, направленные на определение нуклеотидных последовательностей аллелей генов, ассоциированных с высоким или низким качеством зерна, актуальны, так как их результаты могут быть использованы в маркер-ориентированной и геномной селекции мягкой пшеницы.

В ходе генотипирования 95 сортов мягкой пшеницы по составу генов запасных белков (Галимова и др., 2023) нами были идентифицированы генотипы, несущие ранее неизвестные нуклеотидные последовательности x-типа, кодируемые локусом *Glu-B1-1* (обозначение в соответствии с Каталогом генных символов пшеницы (McIntosh et al., 2013)). Они обнаружены у сортов Авеста, Ленинградка крупнозерная и линии С-75094. В настоящей работе описаны эти новые делеции и замены, а также приведены некоторые характеристики предсказанных фраг-

ментов аминокислотных последовательностей субъединиц данных аллельных вариантов высокомолекулярных глютенинов.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили озимые сорта мягкой пшеницы Стерлинская (используется в качестве контрольного образца – сорта, несущего аллель субъединицы x-типа – Vx7), Авеста, яровые сорта Ленинградка крупнозерная и линия С-75094, полученные из коллекции генетических ресурсов растений Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР). По данным ВИР, сорт Ленинградка крупнозерная и линия С-75094 обладают низкими хлебопекарными качествами. В соответствии с данными, приведенными в Госреестре селекционных достижений (<https://reestr.gossortrf.ru/sorts/9358556/>, дата обращения 15.10.2022), сорт Авеста характеризуется хлебопекарными качествами на уровне хорошего филлера.

Геномную ДНК из высушенных листьев мягкой пшеницы выделяли с помощью ЦТАБ (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). Для амплификации фрагмента гена *Glu-B1-1* использовали пару праймеров VxF/VxR (Ma et al., 2003). Прямой праймер VxF отжигается на двух участках гена *Glu-B1-1*, формируя в ходе ПЦР вместе с обратным праймером два продукта реакции размерами 766 и 630 п.о. Амплификацию ДНК осуществляли по программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин; 35 циклов: денатурация – 95 °С, 40 с, отжиг праймеров – 58 °С, 40 с, элонгация – 72 °С, 1 мин; конечная элонгация – 72 °С, 3 мин. Визуализацию результатов амплификации проводили в 1.6 % агарозных гелях с маркерами длин фрагментов ДНК 100 bp («Евроген», Россия).

Для секвенирования продуктов ПЦР брали в среднем 500 нг каждого продукта ПЦР, полученного выше. Продукты очищали с помощью реакции: 1 ЕД щелочной фосфатазы (NEB, США) и 10 ЕД экзонуклеазы I (NEB, США) в конечном объеме 10 мкл при 37 °С в течение 15 мин с последующей инактивацией фермента при 85 °С в течение 15 мин. 1 мкл (~50 нг) каждого из очищенных образцов непосредственно использовали в качестве матрицы для секвенирования. Реакцию ставили с 10 пМ праймера и 0.5 мкл BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix в конечном объеме 10 мкл. Последовательность циклов сек-

венирующей реакции: денатурация – 96 °С в течение 10 с, отжиг праймера – 58 °С, 5 с, элонгация – 60 °С, 4 мин для всех 30 циклов. Флуоресцентно меченые продукты ПЦР анализировали на секвенаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

При секвенировании фрагментов исследуемых генов каждого образца использовали три биологические повторности. Секвенирование проводили с двух концов при помощи праймеров VxF и VxR. Далее для каждого образца путем выравнивания трех полученных последовательностей было составлено по одной консенсусной последовательности. Данная процедура проводилась, прежде всего, для избегания возможных ошибок при секвенировании. Выравнивание последовательностей нуклеотидов методом Clustal W и обнаружение предполагаемых мутаций выполнены в программе MEGA версии 11.0.8 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11).

Результаты

В ходе генотипирования 95 сортов и линий мягкой пшеницы по генам *Glu-1* субгеномов А, В и D геном-специфичными праймерами (Галимова и др., 2023) нами обнаружены ранее не описанные делеции в нуклеотидной последовательности гена *Glu-B1*, кодирующего ВМСГ х-типа (*Glu-B1-1*). При анализе аллельного состояния гена *Glu-B1-1* ожидаемыми продуктами реакции амплификации являлись ампликоны размером 766 и 630 п. о. Нарботка продуктов реакции указанных размеров свидетельствовала бы о том, что сорт несет аллель субъединицы х-типа – Vx7 (в настоящем исследовании в качестве контроля взят сорт Стерлинская). Однако в случае трех сортов и линий (Авеста, Ленинградка крупнозерная, С-75094) в ходе генотипирования были обнаружены продукты реакции, отличные от ожидаемых: один продукт реакции вместо двух, имеющий размеры 766 п. о. или ~669 п. о. и ранее не описанный в литературе. При амплификации геномной ДНК сорта Ленинградка крупнозерная выделен только один продукт реакции размером 766 п. о. При амплификации ДНК сорта Авеста и линии С-75094 также образовался один продукт реакции, при этом на электрофореграмме выявлен ампликон размером больше 630 п. о. и меньше 700 п. о. В литературе имеются данные о наработке продуктов ПЦР размером 669 п. о. при использовании пары праймеров VxF/VxR (Ma et al., 2003). Это дало нам основание полагать, что продукты ПЦР генотипов Авеста и С-75094 представляют собой описанный ранее фрагмент гена *Glu-B1-1* размером 669 п. о. (Галимова и др., 2023). Поэтому далее размер этого ПЦР-продукта мы обозначали как ~669 п. о. (рис. 1, табл. 1).

Затем для определения нуклеотидных последовательностей обнаруженных фрагментов гена *Glu-B1-1* было проведено их секвенирование. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *Glu-B1-1* генотипов Авеста и С-75094 с известными аннотированными последовательностями ДНК и РНК из базы данных GenBank не выявил полной идентичности между ними. Выравнивание нуклеотидной последовательности фрагментов гена *Glu-B1-1* образцов С-75094 и Авеста показало их сходство с субъединицей х-типа аллеля *i*, который имеет три делеции относительно аллеля *a*. В рас-

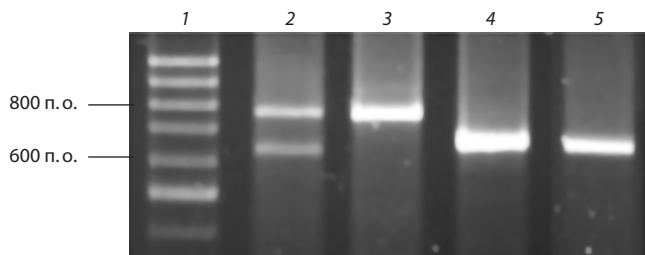


Рис. 1. Электрофореграмма результатов амплификации фрагмента гена *Glu-B1-1* праймерами VxF/VxR.

1 – маркер длин фрагментов ДНК 100 bp («Евроген», Россия); 2 – сорт Стерлинская с ожидаемыми размерами ампликонов 766 + 630 п. о.; 3 – сорт Ленинградка крупнозерная (766 п. о.); 4 – сорт Авеста (~669 п. о.); 5 – линия С-75094 (~669 п. о.).

Таблица 1. Ожидаемые и фактические длины ампликонов при генотипировании исследуемых генотипов мягкой пшеницы с использованием праймеров VxF/VxR

Сорт/линия	Размер ампликона, п. о.	
	ожидаемый	фактический
Стерлинская	766 + 630	766 + 630
Ленинградка крупнозерная		766
Авеста		~669
С-75094		

сматриваемых нами образцах выявлены только две из них (рис. 2, а–в). Таким образом, размер амплифицированного и секвенированного нами фрагмента гена *Glu-B1-1* составил 687 п. о.

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Glu-B1-1* сорта Ленинградка крупнозерная, для которого был выявлен продукт амплификации размером 766 п. о., показал, что в одном из двух участков отжига прямого праймера VxF произошли две однонуклеотидные замены (G→A и A→G), которые, вероятно, препятствуют отжигу прямого праймера (рис. 3). Предположительно, в результате этого образуется только один продукт реакции вместо ожидаемых двух.

Поскольку ген *Glu-B1-1* исследуемых генотипов (Авеста, Ленинградка крупнозерная, С-75094) был секвенирован не полностью, он дополнен с двух концов фланкирующими участками аллеля *Glu-B1a* (номер GenBank VK006773) для проведения сравнительного анализа их аминокислотных последовательностей. Таким образом, анализ предсказанных аминокислотных последовательностей белка Glu-B1-1 рассматриваемых генотипов осуществлялся на основании данных, полученных в результате секвенирования фрагмента гена *Glu-B1-1*.

Центральная часть белка Glu-B1-1 представлена вторичными мотивами из три-, гекса- и нонапептидов GQQ, PGQGQQ и GYYTSPQQ. Несмотря на то что у аминокислотных последовательностей генотипов Авеста и С-75094 число аминокислот отличается от числа ами-

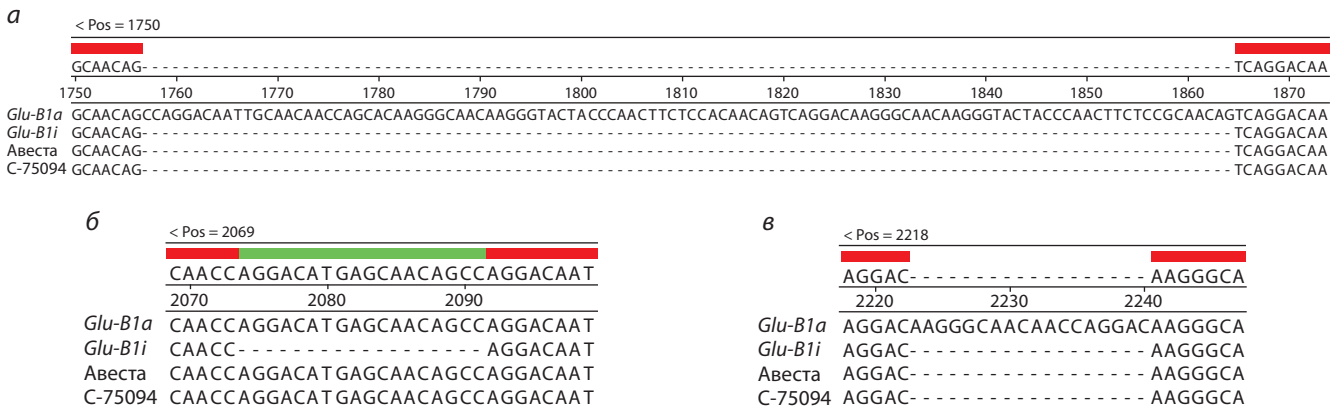


Рис. 2. Результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *Glu-B1-1* генотипов Авеста и C-75094 с нуклеотидными последовательностями *Glu-B1-1* аллелей *Glu-B1a* (номер GenBank VK006773) и *Glu-B1i* (номер GenBank AB263219).

a – делеция (нуклеотиды 1757–1864); *б* – делеция (нуклеотиды 2074–2091, данной делецией отличаются нуклеотидные последовательности *Glu-B1-1* аллеля *Glu-B1i* и изучаемых генотипов Авеста и C-75094); *в* – делеция (нуклеотиды 2223–2240).

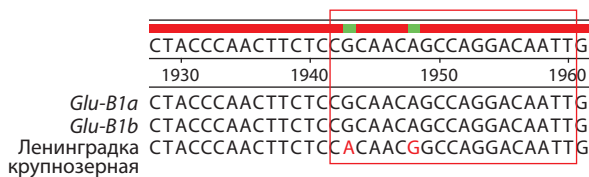


Рис. 3. Однонуклеотидные замены (G→A и A→G) в нуклеотидной последовательности гена *Glu-B1-1* сорта Ленинградка крупнозерная на месте отжига прямого праймера VxF.

Красной рамкой выделено место отжига прямого праймера VxF.

нокислот сорта-носителя аллеля *Glu-B1i*, все три сравниваемые аминокислотные последовательности имеют одинаковое количество повторов три-, гекса- и нонапептидов (табл. 2).

Существенные различия в количестве остатков аминокислот и мотивов наблюдаются при сравнении аминокислотных последовательностей трех упомянутых сортов и линий с аминокислотной последовательностью сорта-носителя аллеля *Glu-B1a*. Так, в аминокислотной последовательности аллеля *Glu-B1a* содержатся 44 трипептида GQQ, 18 гексапептидов PGQGQQ и 11 нонапептидов GYYPTSPQQ, тогда как в аминокислотных последова-

тельности сортов-носителей аллеля *Glu-B1i* и в образцах Авеста и C-75094 количество пептидов уменьшается на три, один и два мотива соответственно (рис. 4, см. табл. 2).

Анализ количества аминокислот в предсказанных аминокислотных последовательностях четырех сравниваемых генотипов показал уменьшение количества остатков Е (глутаминовая кислота), Н (гистидин), Q (глутамин), Р (пролин), G (глицин) у образцов Авеста, C-75094 и у сорта с аллелем *Glu-B1i*, по сравнению с сортом, несущим аллель *Glu-B1a* (см. табл. 2). Так, значительная разница в количестве глутаминов выявлена в аминокислотных последовательностях аллеля *Glu-B1a* и последовательностях аминокислот остальных образцов: *n*–18 остатков глутамина в аллеле *Glu-B1i* и *n*–16 – в последовательностях аминокислот генотипов Авеста и C-75094. Помимо глутамина, в аминокислотных последовательностях *Glu-B1-1* образцов Авеста и C-75094 имеются различия в количестве пролинов (*n*–7) и глицинов (*n*–8). Сорт, несущий аллель *Glu-B1i* (номер GenBank AB263219), отличается, кроме глутамина, по числу еще четырех аминокислот: глутаминовой кислоты, гистидина, пролина и глицина (см. табл. 2, рис. 4). Из анализа предсказанных фрагментов аминокислотной последовательности видно, что у секвенированного фрагмента глютеина образцов

Таблица 2. Количество повторяющихся мотивов ВМСГ и аминокислотных остатков в исследуемом участке белка *Glu-B1-1*

Аллель/генотип	Количество повторов мотивов локуса <i>Glu-B1-1</i>			Количество аминокислотных остатков				
	Трипептид GQQ	Гексапептид PGQGQQ	Нонапептид GYYPTSPQQ	Е	Н	Q	Р	G
<i>Glu-B1a</i>	44	18	11	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
<i>Glu-B1i</i>	41	17	9	<i>n</i> –1	<i>n</i> –1	<i>n</i> –18	<i>n</i> –8	<i>n</i> –9
<i>Glu-B1-1</i> (Авеста, C-75094)	41	17	9	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i> –16	<i>n</i> –7	<i>n</i> –8
<i>Glu-B1-1</i> (Ленинградка крупнозерная)	43	17	11	<i>n</i>	<i>n</i> –1	<i>n</i> –1+1	<i>n</i>	<i>n</i> –2

Примечание. Обозначения аминокислотных остатков: Е – глутаминовая кислота, Н – гистидин, Q – глутамин, Р – пролин, G – глицин. *n* – количество аминокислотных остатков белка *Glu-B1-1* генотипа (сорта), несущего аллель *Glu-B1a*; *n*–1+1 – замена, ведущая к образованию аминокислоты глутамином (Н→Q), и замена глутамина другой аминокислотой (Q→R).

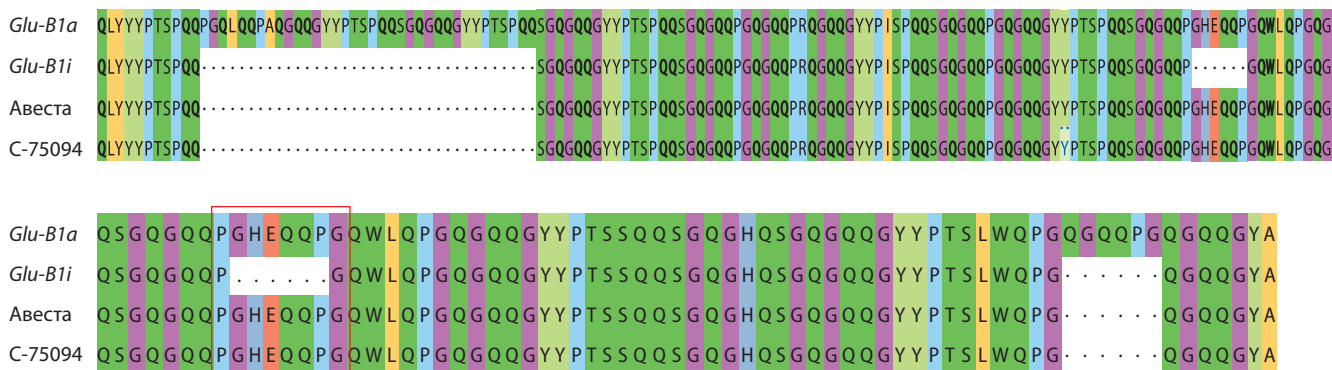


Рис. 4. Результаты выравнивания предсказанных аминокислотных последовательностей белка *Glu-B1-1* сортов, несущих аллели *Glu-B1a*, *Glu-B1i*, и изучаемых образцов *Авеста*, *С-75094*.

Красной рамкой выделен участок, по которому аминокислотные последовательности образцов *Авеста* и *С-75094* отличаются от аминокислотной последовательности белка, закодированного аллелем *Glu-B1i*.

Авеста, Ленинградка крупнозерная и *С-75094* отсутствуют вновь возникшие остатки цистеина, значимые для образования дисульфидных связей (см. табл. 2, рис. 4).

Выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей сортов, несущих аллели *Glu-B1a*, *Glu-B1i*, и исследуемых образцов *Авеста* и *С-75094* показало, что потери аминокислот локализируются в центральном домене белка и влияют на количество три-, гекса- и нонапептидов (см. рис. 4). Однако необходимо отметить, что по количеству мотивов аминокислотные последовательности образцов *Авеста* и *С-75094* не отличаются от аминокислотной последовательности *Glu-B1-1*, закодированной аллелем *Glu-B1i*. При этом генотипы *Авеста* и *С-75094* отличаются от аллеля *Glu-B1i* количеством остатков глутаминовой кислоты, гистидина, глутамина, пролина и глицина.

Сравнительный анализ предсказанных аминокислотных последовательностей сорта Ленинградка крупнозерная и сорта, несущего аллель *Glu-B1a*, показал уменьшение количества трипептида GQQ и гексапептида PGQGQQ на одну единицу (см. табл. 2). Кроме того, выявлены замены пяти аминокислот, среди которых надо отметить замены двух остатков глицина ($G \rightarrow R$, $G \rightarrow W$), а также две замены, одна из которых ведет к образованию аминокислоты глутамин ($H \rightarrow Q$), а вторая – к замещению глутамина аргинином ($Q \rightarrow R$).

Обсуждение

Полиморфизм генов ВМСГ, вероятнее всего, является одной из причин высокой генетической изменчивости признаков мягкой пшеницы, влияющих на технологические и реологические свойства муки и, как следствие, на хлебопекарные качества (Patil et al., 2015; Ravel et al., 2020). В ходе генотипирования различных сортов и линий мягкой пшеницы по локусу *Glu-B1-1* нами идентифицированы ампликоны, длины нуклеотидных последовательностей которых не соответствовали ожидаемым. Обнаруженные в данной работе изменения в нуклеотидном составе гена субъединицы х-типа *Glu-B1* ранее не были описаны.

Зерлы ВМСГ состоят из N- и C-концевых доменов и центрального домена, который состоит из повторяющихся мотивов (Shewry et al., 1992). N- и C-концы содержат

больше заряженных остатков, чем центральный домен, и включают большую часть или все остатки цистеина, присутствующие в субъединицах. Домены повторов характеризуются три-, гекса-, и нонапептидными мотивами в субъединицах х-типа (GQQ, PGQGQQ и GYYPTSPQQ) и гекса- и нонапептидными повторами в субъединицах у-типа (PGQGQQ и GYYPTSLQQ) (Tatham et al., 1990). Таким образом, к определению эластичности белка могут иметь отношение две особенности структуры ВМСГ: количество и распределение дисульфидных связей, а также свойства и взаимодействия повторяющихся мотивов центрального домена (Kohler et al., 1994).

Дисульфидные связи чрезвычайно важны для структуры клейковины и являются значимыми факторами при определении вязкоупругих и реологических свойств теста (Lindsay et al., 2000; Li et al., 2016). Внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи образуются между остатками цистеина (Wang et al., 2021). Для предсказанных фрагментов аминокислотных последовательностей изученных генотипов был проведен анализ содержания остатков цистеина, который показал отсутствие изменений в их количестве.

Хотя межцепочечные дисульфидные связи имеют решающее значение для стабилизации полимеров ВМСГ, работы, проведенные с использованием ядерного магнитного резонанса, показывают, что водородные связи, опосредованные боковыми цепями глутамина, тоже могут играть важную роль в стабилизации структуры клейковины (Belton, 1994; Belton et al., 1995). Большое содержание остатков глутамина обладает высокой способностью образовывать как внутри-, так и межмолекулярные водородные связи и положительно влияет на эластичность теста (Belton, 1999; Guo et al., 2019). У исследованных нами генотипов как раз обнаружены изменения в содержании глутамина (см. табл. 2). Отметим, что для образцов *Авеста* и *С-75094* характерно наличие большего числа остатков глутамина по сравнению с сортом-носителем аллеля *Glu-B1i*.

Согласно литературным данным, вариации в центральном повторяющемся домене белков глютелинов являются основными причинами различий в размере его субъединиц

(Anderson, Greene, 1989; Halford et al., 1992; Shewry et al., 1992; D'Ovidio et al., 1995), что было показано и в нашей работе. Из анализа центрального участка предсказанного белка ВМСГ у образцов Авеста и С-75094 видно, что они отличаются от известной последовательности аминокислот сортов, несущих аллель *Glu-B1a*, количеством мотивов (всех трех типов) и, соответственно, числом аминокислот. От аминокислотной последовательности аллеля *Glu-B1i* они отличаются лишь числом аминокислот. Так, количество мотивов центрального домена у образцов Авеста и С-75094 и у аллеля *Glu-B1i* одинаково – 41 трипептид, 17 гексапептидов и 9 нонапептидов, но количество аминокислотных остатков у них разное (см. табл. 2, рис. 4). Для ярового сорта Ленинградка крупнозерная показано уменьшение количества три- и гексапептидов по сравнению с аминокислотной последовательностью сорта-носителя аллеля *Glu-B1a* (см. табл. 2). Таким образом, аминокислотные последовательности сортов Авеста, Ленинградка крупнозерная и образца С-75094 имеют меньшее количество повторов мотивов по сравнению с сортом, несущим аллель *Glu-B1a*.

Известно, что длина центрального домена, т. е. количество повторов его мотивов, влияет на эластичность теста (Gianibelli et al., 2001). Возможно, у генотипов Авеста, С-75094 и Ленинградка крупнозерная одним из факторов невысоких хлебопекарных качеств является уменьшение количества повторов мотивов GQQ, PGQGQQ, GYYPTSPQQ и количества аминокислотных остатков глутамина и глицина в составе белка Glu-B1-1.

Заключение

В работе описаны ранее неизвестные нуклеотидные последовательности гена ВМСГ α -типа – *Glu-B1-1*, которые были обнаружены в ходе генотипирования аллелей генов *Glu-1* у сортов Авеста, Ленинградка крупнозерная и линии С-75094. Выявленные мутации могут быть использованы при генотипировании сортов и линий мягкой пшеницы по генам ВМСГ. Также они могут быть предложены в качестве ДНК-маркеров в селекции, однако для этого требуется дальнейший детальный анализ на предмет влияния выявленных мутаций на хлебопекарные качества зерна. Различия в последовательности нуклеотидов гена *Glu-B1-1* приводят к изменениям в предсказанных аминокислотных последовательностях их белков. У изученных генотипов предсказаны изменения в количестве три-, гекса- и нонапептидных повторов центрального домена белка, а также выявлены изменения в количестве остатков глутамина и глицина. Поскольку длина центрального домена, а также аминокислотный состав его повторяющихся мотивов значимы при определении внутри- и межмолекулярных взаимодействий молекулы белка, результаты исследования могут быть приняты во внимание при анализе вязкоупругих свойств теста и хозяйственно ценных признаков у изученных сортов и линий.

Список литературы / References

Галимова А.А., Кулуев А.Р., Исмагилов К.Р., Кулуев Б.Р. Генетический полиморфизм локусов высокомолекулярных субъединиц глютенина у сортообразцов мягкой пшеницы Предуральской степной зоны. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(4):297-305. DOI 10.18699/VJGB-23-36.

- [Galimova A.A., Kuluev A.R., Ismagilov K.R., Kuluev B.R. Genetic polymorphism of high-molecular-weight glutenin subunit loci in bread wheat varieties in the Pre-Ural steppe zone. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(4):297-305. DOI 10.18699/VJGB-23-36.]
- Anderson O.D., Greene F.C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1989;77:689-700. DOI 10.1007/BF00261246.
- Belton P.S. A hypothesis concerning the elasticity of high molecular weight subunits. In: *Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects*. Proceedings of the International Meeting, S. Martino Al Cimino, Viterbo (Italy), September 28–30, 1994. Viterbo: Università degli studi della Tuscia, 1994;159-165.
- Belton P.S. Mini review: on the elasticity of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 1999;29(2):103-107. DOI 10.1006/jcers.1998.0227.
- Belton P.S., Colquhoun I.J., Grant A., Wellner N., Field J.M., Shewry P.R., Tatham A.S. FTIR and NMR studies on the hydration of a high- M_r subunit of glutenin. *Int. J. Biol. Macromol.* 1995;17(2):74-80. DOI 10.1016/0141-8130(95)93520-8.
- D'Ovidio R., Masci S., Porceddu E. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the *Glu-1* complex loci of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:189-194. DOI 10.1007/BF00220876.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19(1):11-15.
- Gianibelli M.C., Larroque O.R., MacRitchie F., Wrigley C.W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 2001;78(6):635-646. DOI 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635.
- Guo H., Wu J., Lu Y., Yan Y. High-molecular-weight glutenin 1Bx17 and 1By18 subunits encoded by *Glu-B1i* enhance rheological properties and bread-making quality of wheat dough. *J. Food Qual.* 2019;2019:1958747. DOI 10.1155/2019/1958747.
- Halford N.G., Field J.M., Blair H., Urwin P., Moore K., Robert L., Thompson R., Flavell R.B., Tatham A.S., Shewry P.R. Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theor. Appl. Genet.* 1992;83:373-378. DOI 10.1007/BF00224285.
- Kohler P., Keck B., Muller S., Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten. In: *Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects*. Proceedings of the International Meeting, S. Martino Al Cimino, Viterbo (Italy), September 28–30, 1994. Viterbo: Università degli studi della Tuscia, 1994;45-54.
- Li X.J., Liu T.H., Song L.J., Zhang H., Li L.Q., Gao X. Influence of high-molecular-weight glutenin subunit composition at *Glu-A1* and *Glu-D1* loci on secondary and micro structures of gluten in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Food Chem.* 2016;213:728-734. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.07.043.
- Lindsay M.P., Tamas L., Appels R., Skerritt J.H. Direct evidence that the number and location of cysteine residues affect glutenin polymer structure. *J. Cereal Sci.* 2000;31(3):321-333. DOI 10.1006/jcers.2000.0309.
- Ma W., Zhang W., Gale K. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica*. 2003;134:51-60. DOI 10.1023/A:1026191918704.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. In: *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*. Proceed. of the 12th International Wheat Genetics Symposium. Yokohama, 2013;84-95.
- Nucia A., Okoń S., Tomczyńska-Mleko M. Characterization of HMW glutenin subunits in European spring common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* 2019;66:579-588. DOI 10.1007/s10722-018-00733-x.
- Patil V.R., Talati J.G., Singh C., Parekh V.B., Jadeja G.C. Genetic variation in glutenin protein composition of aestivum and durum wheat

- cultivars and its relationship with dough quality. *Int. J. Food Properties*. 2015;18(9-12):2393-2408. DOI 10.1080/10942912.2014.980948.
- Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1987; 38:141-153. DOI 10.1146/annurev.pp.38.060187.001041.
- Ravel C., Faye A., Ben-Sadoun S., Ranoux M., Dardevet M., Dupuits C., Exbrayat F., Poncet Ch., Sourdille P., Branlard G. SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2020; 133(3):751-770. DOI 10.1007/s00122-019-03505-y.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. In: Mifflin B.J. (Ed.) *Oxford Surveys of Plant and Molecular Cell Biology*. London: Oxford Univ. Press, 1989;163-219.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 1992;15(2):105-120. DOI 10.1016/S0733-5210(09)80062-3.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Barro F., Barcelo P., Lazzeri P. Biotechnology of breadmaking: unravelling and manipulating the multi-protein gluten complex. *BioTechnology*. 1995;13:1185-1190. DOI 10.1038/nbt1195-1185.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Lazzeri P. Biotechnology of wheat quality. *J. Sci. Food Agric.* 1997;73(4):397-406. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199704)73:4<397::AID-JSFA758>3.0.CO;2-Q.
- Tatham A.S., Drake A.F., Shewry P.R. Conformational studies of synthetic peptides corresponding to the repetitive region of the high molecular weight (HMW) glutenin subunits of wheat. *J. Cereal Sci.* 1990;11(3):189-200. DOI 10.1016/S0733-5210(09)80163-X.
- Vafin R., Rzhanova I., Askhadullin D., Askhadullin D., Vasilova N. Screening of the genotypes of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the allelic variants of *Waxy* genes and HMW glutenin subunits. *Acta Agrobot.* 2018;71(4):1746. DOI 10.5586/aa.1746.
- Wang L., Yu J.J., Wang C.C. Protein disulfide isomerase is regulated in multiple ways: consequences for conformation, activities, and pathophysiological functions. *BioEssays*. 2021;43(3):2000147. DOI 10.1002/bies.202000147.

ORCID ID

A.A. Galimova orcid.org/0000-0002-7068-3359
B.R. Kuluev orcid.org/0000-0002-1564-164X

Благодарности. Работы по генотипированию и поиску ДНК-маркеров мягкой пшеницы поддержаны грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.). Исследования по секвенированию и анализу нуклеотидных последовательностей генов глютелинов проводятся в рамках государственного задания № 122030200143-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.10.2022. После доработки 27.04.2023. Принята к публикации 12.05.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Аллельные варианты 5'-UTR и экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* у инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. российской селекции

Д.Х. Архестова^{1,2}, Б.Р. Шомахов², А.В. Щенникова¹✉, Е.З. Кочиева^{1,3}

¹ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт сельского хозяйства – филиал Федерального научного центра «Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук», Нальчик, Россия

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

✉ shchennikova@yandex.ru

Аннотация. Селекционная биофортификация направлена на обогащение съедобных частей растения микроэлементами. В рамках данной стратегии молекулярный скрининг коллекций различных культур позволяет определять аллельные варианты генов, новые аллели и сцепленность аллельных вариантов с морфологическими признаками. Кукуруза *Zea mays* L. является важной зерновой и силосной культурой, а также источником основного предшественника витамина А – β-каротина, производного β,β-ветви пути биосинтеза каротиноидов. Параллельная β,ε-ветвь запускается ликопин-ε-циклазой *LCYE*, низкая экспрессия которой приводит к росту содержания провитамина А и связана с вариабельностью регуляторной последовательности 5'-UTR гена. В настоящем исследовании проведены скрининг коллекции 165 инбредных линий кукурузы российской селекции на варианты аллелей 5'-UTR *LCYE*, а также поиск зависимости уровня экспрессии гена *LCYE* от аллельного варианта 5'-UTR в листьях 14 коллекционных линий. Проанализированные 165 линий разделились на три группы, несущие аллели А2 (64 линии), А5 (31) и А6 (70). В сравнении с А2, аллель А5 содержал две делеции (в позициях -267–260 и -296–290 от АТГ-кодона) и замену G₂₅₁→Т, тогда как аллель А6 – одну делецию (-290–296) и две замены (G₂₅₁→Т, G₂₆₅→Т). Анализ экспрессии гена *LCYE* в листовой ткани проростков образцов 14 линий, различающихся аллельными вариантами, показал отсутствие ассоциаций варианта аллеля 5'-UTR *LCYE* с уровнем экспрессии гена. Четыре линии, несущие аллели А2 (образцы 6178-1, 6709-2, 2289-3) и А5 (образец 5677), имели значительно более высокий уровень экспрессии гена *LCYE* (~0.018–0.037) по сравнению с остальными десятью проанализированными линиями (~0.0001–0.004), среди которых были представлены все три аллельных варианта.

Ключевые слова: *Zea mays* L.; инбредные линии кукурузы; ликопин-ε-циклаза; аллели *LCYE*; экспрессия гена.

Для цитирования: Архестова Д.Х., Шомахов Б.Р., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Аллельные варианты 5'-UTR и экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* у инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. российской селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):440-446. DOI 10.18699/VJGB-23-53

5'-UTR allelic variants and expression of the lycopene-ε-cyclase *LCYE* gene in maize (*Zea mays* L.) inbred lines of Russian selection

D.Kh. Arkhestova^{1,2}, B.R. Shomakhov², A.V. Shchennikova¹✉, E.Z. Kochieva^{1,3}

¹ Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Agriculture – Branch of the Federal Scientific Center “Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Nalchik, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

✉ shchennikova@yandex.ru

Abstract. In breeding, biofortification is aimed at enriching the edible parts of the plant with micronutrients. Within the framework of this strategy, molecular screening of collections of various crops makes it possible to determine allelic variants of genes, new alleles, and the linkage of allelic variants with morphophysiological traits. The maize (*Zea mays* L.) is an important cereal and silage crop, as well as a source of the main precursor of vitamin A – β-carotene, a derivative of the β,β-branch of the carotenoid biosynthesis pathway. The parallel β,ε-branch is triggered by lycopene-ε-cyclase *LCYE*, a low expression of which leads to an increase in provitamin A content and is associated with the variability of the 5'-UTR gene regulatory sequence. In this study, we screened a collection of 165 maize inbred lines of Russian selection for 5'-UTR *LCYE* allelic variants, as well as searched for the dependence of *LCYE* expression levels on the 5'-UTR allelic variant in the leaves of 14 collection lines. 165 lines analyzed were divided into three groups carrying alleles A2 (64 lines), A5 (31) and A6 (70), respectively. Compared to A2, allele A5 contained two deletions (at positions -267–260 and -296–290 from the ATG codon) and a G₂₅₁→T substitution, while allele A6 contained one deletion (-290–296) and two SNPs (G₂₅₁→T, G₂₆₅→T). Analysis of *LCYE* expression in the leaf tissue of seedlings from accessions of 14 lines

differing in allelic variants showed no associations of the 5'-UTR *LCYE* allele type with the level of gene expression. Four lines carrying alleles A2 (6178-1, 6709-2, 2289-3) and A5 (5677) had a significantly higher level of *LCYE* gene expression (~0.018–0.037) than the other 10 analyzed lines (~0.0001–0.004), among which all three allelic variants were present.
Key words: *Zea mays* L.; maize inbred lines; lycopene- ϵ -cyclase; *LCYE* alleles; gene expression.

For citation: Arkhestova D.Kh., Shomakhov B.R., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. 5'-UTR allelic variants and expression of the lycopene- ϵ -cyclase *LCYE* gene in maize (*Zea mays* L.) inbred lines of Russian selection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):440-446. DOI 10.18699/VJGB-23-53

Введение

Кукуруза *Zea mays* L. является важной мировой сельскохозяйственной культурой. Климатические условия в России способствуют тому, что кукуруза преимущественно идет на силос (незрелые початки, листья и стебли), который составляет около 50 % сухого вещества основного корма сельскохозяйственных животных (Cabiddu et al., 2019; Graulet et al., 2019; Mitani et al., 2021). На зерно данная культура выращивается только в южных регионах Российской Федерации. По данным Минсельхоза, в 2021 г. было собрано 1.4 млн тонн зерна кукурузы, что примерно в 50 раз меньше в сравнении с пшеницей (<https://mcs.gov.ru/press-service/news/sbor-zernovykh-v-rossii-dostig-100-mln-tonn/>).

Как зерно, так и силос кукурузы причисляют к важным источникам антиоксидантов, включая провитамин А, представленный тремя каротиноидными соединениями: β -каротин (обеспечивает две единицы ретинола – активного витамина А, при окислительном расщеплении), β -криптоксантин (дает одну единицу ретинола, но с большей биодоступностью по сравнению с β -каротином) и α -каротин (одна единица ретинола) (LaPorte et al., 2022). Помимо диетической значимости, обогащение β -каротином и β -криптоксантином способствует существенному снижению загрязнения зерна кукурузы афлатоксином (Suwarno et al., 2019). В зерне наиболее популярных сортов и гибридов каротиноиды составляют, по разным данным, от 9.55 до 62.96 мкг/г (Trono, 2019), тогда как в листьях – уже около 200 мкг/г (Li et al., 2008; Suwarno et al., 2019).

β -Каротин и β -криптоксантин являются производными β , β -ветви пути биосинтеза каротиноидов (рис. 1), когда ликопин- β -циклаза (*LCYB*) катализирует на обоих концах молекулы полностью-*транс*-ликопина формирование β -иононовых колец с образованием β -каротина, гидроксилирование которого приводит к синтезу ксантофиллов, включая β -криптоксантин (Rosas-Saavedra, Stange, 2016). Молекула α -каротина – продукт β , ϵ -ветви, запускаемой ликопин- ϵ -циклазой *LCYE* (см. рис. 1), содержит β -кольцо на одном и ϵ -кольцо на другом конце изопреноидной цепи (Rosas-Saavedra, Stange, 2016). Характерным признаком преобладания β , β - или β , ϵ -ветви считается оранжевая или светло-желтая соответственно окраска зерна кукурузы (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018).

В селекции, направленной на биообогащение кукурузы провитамином А, используются упомянутый выше ген ликопин- ϵ -циклазы (*LCYE*), а также ген β -каротингидроксилазы 1 (*CrtR1*), катализирующей превращение β -каротина в β -криптоксантин (LaPorte et al., 2022). Снижение уровня экспрессии первого, второго или одновременно обоих генов приводит к смещению метаболического пути в сторону биосинтеза β -каротина как наиболее перспек-

тивного источника провитамина А (Harjes et al., 2008; Yan et al., 2010; Muthusamy et al., 2014; Liu et al., 2015; Zunjare et al., 2018; LaPorte et al., 2022).

Одно из основных условий успешной селекции – наличие доноров аллельных вариантов, сцепленных с желаемыми хозяйственно ценными признаками. Образцы кукурузы, для которых характерна низкая экспрессия в зерне генов *LCYE* и/или *CrtR1*, используются в селекции, в том числе в биофортификации, кукурузы с повышенным содержанием провитамина А в зерне (Pixley et al., 2013; Muthusamy et al., 2014; Liu et al., 2015; Menkir et al., 2017; Prasanna et al., 2020). Показано, что пониженный уровень транскриптов гена *LCYE* может быть связан с полиморфизмами в последовательности 5'-UTR гена (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018).

При всей популярности аллелей *LCYE* в биофортификации современной кукурузы, а также широком использовании кукурузы на силос исследования активности гена ограничены зерном кукурузы и практически не затрагивают фотосинтезирующие органы. Ранее нами была показана обратная зависимость между содержанием β -каротина и уровнем экспрессии гена *LCYE* в ткани листа у проростков кукурузы (Архестова и др., 2022).

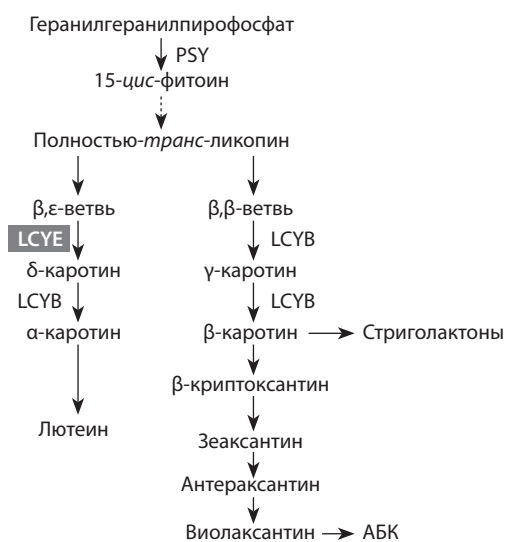


Рис. 1. Упрощенная схема биосинтеза ксантофиллов.

Под действием фитоинсинтазы PSY синтезируется фитоин, из которого в результате нескольких последовательных реакций образуется *транс*-ликопин. Далее метаболический путь разделяется на ветви β , β - и β , ϵ -, и происходит биогенез β -каротина и α -каротина соответственно, а затем β -криптоксантина и ксантофиллов – зеаксантина, антраксантина, виолаксантина (β , β -каротиноиды) и лютеина (β , ϵ -каротиноиды). Преобразование β -каротина и виолаксантина под действием каротиноид-расщепляющих диоксигеназ приводит к синтезу апокаротиноидов – стриголоктанов и абсцизово́й кислоты (АБК) соответственно.

В данной работе проведена оценка корреляций между уровнем экспрессии *LCYE* и аллельными вариантами регуляторной области 5'-UTR гена у коллекции из 165 инбредных линий кукурузы. Также проанализирована зависимость между уровнем экспрессии и аллельным вариантом гена ликопин-ε-циклазы в листьях 14 образцов, различающихся аллелями 5'-UTR *LCYE*. В исследовании были использованы линии кукурузы, полученные в результате селекционной деятельности двух организаций Кабардино-Балкарской Республики (КБР, Северо-Кавказский федеральный округ), занимающей, благодаря климатическим условиям, первое место в РФ по выращиванию кукурузы, согласно выделяемым посевным площадям (данные Росстата за 2021 г.; https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Census_agr_2021.pdf).

Материалы и методы

Для исследования использовали 165 образцов инбредных линий кукурузы *Z. mays* двух селекционных организаций (ООО ССЦ «ОТБОР» и ИСХ КБНЦ РАН). Линии в настоящее время проходят тестирование и приведены в работе под номерами, присвоенными им селекционерами (см. Приложение)¹.

Семенной материал растений, выращенных в полевых условиях в 2022 г. (КБР, Россия), был любезно предоставлен сотрудниками ООО ССЦ «ОТБОР» (КБР, Россия) и Института сельского хозяйства филиала Кабардино-Балкарского научного центра РАН (ИСХ КБНЦ РАН, КБР, Россия). Согласно данным оригинаторов (ООО ССЦ «ОТБОР», ИСХ КБНЦ РАН), линии различаются окраской зерна (рис. 2, см. Приложение). Зерна проращивали до появления четвертого истинного листа в увлажненной почве, в условиях экспериментальной установки искусственного климата (23/25 °C, 16/8 ч – день/ночь; ЭУИК ФИЦ Биотехнологии РАН). Листовой материал собирали и использовали для анализа аллельных вариантов гена *LCYE* и генной экспрессии.

Для идентификации аллельных вариантов из листового материала выделяли геномную ДНК, согласно (Филлюшин и др., 2023), и использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации участка последовательности 5'-UTR гена *LCYE* при следующих условиях: исходная денатурация (5 мин, 95 °C), 32 цикла (денатурация 1 мин, 95 °C; отжиг 30 с, 60 °C; синтез 45 с, 72 °C). Последовательности праймеров для амплификации: F2 (5'-AAG CATCCGACCAAAATAACAG-3') и R2 (5'-GAGAGGG AGACGACGAGACAC-3') (Harjes et al., 2008). Нарботанные фрагменты вырезали из геля (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, ZymoResearch, США) и секвенировали (праймер F2) на секвенаторе ABI 310 Capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, США; ЦКП «Биоинженерия» РАН, Россия). Структурный анализ проводили с помощью NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016).

Для анализа экспрессии гена суммарную РНК выделяли из 50–100 мг листовой ткани проростков с помощью RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия), чистили от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN)

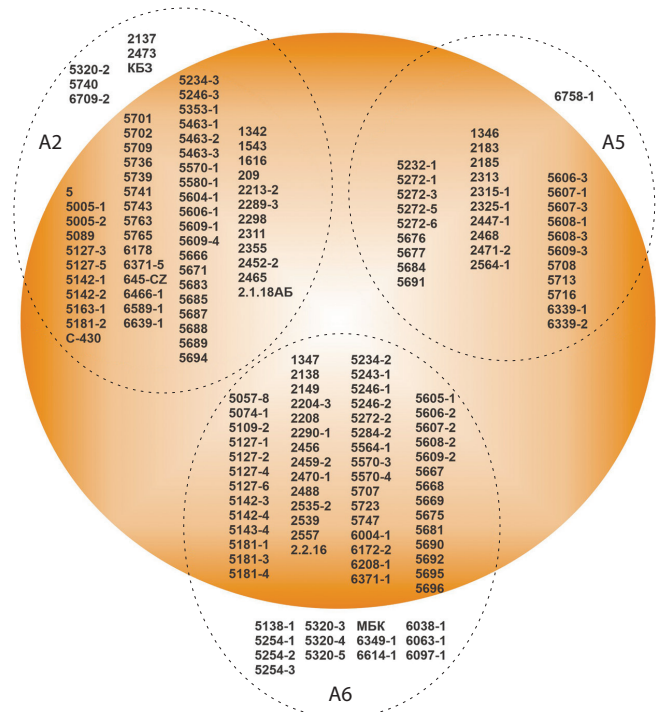


Рис. 2. Распределение 165 инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. отечественной селекции, использованных в работе, по окраске зерна и аллельному варианту 5'-UTR гена *LCYE*.

Разграничено эллипсами; внутри каждого указан соответствующий аллель – A2, A5 или A6. Белозерные образцы помещены в неокрашенную часть эллипсов; линии с окраской зерна в различных оттенках желтого, оранжевого и красного расположены в окрашенной части.

и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Качество РНК оценивали электрофорезом в 1.5 % агарозном геле. Концентрацию препаратов РНК и кДНК определяли флуориметрически: прибор Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США); реактивы Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США).

Уровень транскриптов гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* в листьях проростков кукурузы определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Данные нормализовали на уровень транскриптов гена *Zea mays polyubiquitin* (NM_001329666.1; праймеры ZmUBI-rtF 5'-ATCG TGGTTGTGGCTTCGTTG-3' и ZmUBI-rtR 5'-GCTGCA GAAGAGTTTTGGGTACA-3'). Для реакции использовали 3 нг кДНК-матрицы, кДНК-специфичные праймеры (ZmLcyE-F: 5'-TTTACGTGCAAATGCAGTCAA-3' и ZmLcyE-R: 5'-TGACTCTGAAGCTAGAGAAAG-3'), набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в трех технических и двух биологических повторах в следующих условиях: предварительная денатурация (5 мин, 95 °C); 40 циклов (15 с, 95 °C; 50 с, 62 °C).

Результаты РВ-ПЦР статистически обрабатывали с помощью GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Дан-

¹ Приложение см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx15.pdf>

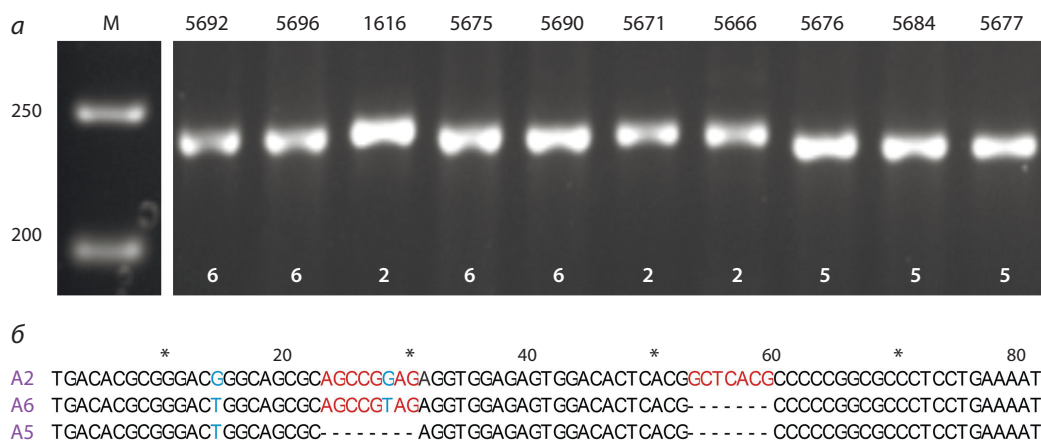


Рис. 3. Пример электрофоретического разделения фрагментов ПЦР-амплификации (а), соответствующих аллельным вариантам 5'-UTR *LCYE* A2 (248 п. н.), A5 (233 п. н.) и A6 (240 п. н.), в 2,5% агарозном геле (М – маркер длин Thermo Fisher GeneRuler 50 bp) и сравнительное выравнивание варибельного участка аллелей A2, A5 и A6 (б). Красным выделены индели, синим – SNP.

ные выражали как среднее значение со стандартным отклонением (\pm SD) на основе трех технических и двух биологических повторов. Для оценки достоверности различий в экспрессии гена между линиями кукурузы использовали *t*-test ($p < 0.05$ указывает на статистическую значимость различий).

Результаты

Исследование было сфокусировано на характеристике аллельной варибельности последовательности 5'-UTR гена *LCYE* в инбредных линиях кукурузы отечественной селекции, а также анализе уровня транскриптов гена в листовой ткани проростков образцов линий, различающихся аллельными вариантами 5'-UTR гена *LCYE*.

Для определения аллельных вариантов гена ликописин-циклазы была проведена амплификация и секвенирование участка 5'-UTR гена *LCYE* (рис. 3). Ожидаемые размеры фрагментов: аллели A2 (248 п. н., согласно (Narjes et al., 2008)), A5 (233 п. н., согласно (Архестова и др., 2023)) и A4 (993 п. н., согласно (Narjes et al., 2008)).

По результатам исследований вариантов A4 не обнаружено. У анализируемых образцов были выявлены аллели A2 и A5. Кроме этих вариантов, выявлен новый, не охарактеризованный ранее аллель A6 (240 п. н.) (см. рис. 3). Всего из проанализированных 165 образцов кукурузы 64 линии содержали аллель A2, 31 линия (наименьшее число образцов) – аллель A5, 70 образцов (наибольшее число) – аллель A6 (см. рис. 2).

Определено, что, в отличие от A2, 5'-UTR аллеля A5 содержит две делеции (в позициях -267–260 и -296–290 от ATG-кодона), тогда как у нового аллеля A6 присутствует только одна из этих делеций (в позиции -290–296 от ATG-кодона) (см. рис. 3). Кроме того, были найдены аллель-специфические однонуклеотидные замены в сравнении с A2: G₂₅₁→T (в последовательностях A5 и A6); G₂₆₅→T (только у A6) (см. рис. 3). Позиции делеций и замен приведены в соответствии с доступной в базе данных NCBI последовательностью гена *LCYE* (NCBI Gene ID OK032387.1).

Варианты аллелей A2/A5/A6 были найдены у 59/30/57 белозерных и 5/1/13 образцов с пигментированным зерном соответственно. Для того чтобы понять, связан ли вариант (A2, A5 или A6) аллеля 5'-UTR *LCYE* с уровнем экспрессии гена в фотосинтезирующей ткани, в листовой ткани проростков образцов 14 линий, различающихся аллельными вариантами, был проанализирован уровень транскриптов гена *LCYE* (рис. 4). Образцы для РВ-ПЦР отбирали, исходя из двух предпосылок. Первое – в анализе должны были быть представлены все три типа аллелей (A2, A5 и A6) гена *LCYE*. Второе – предпочтение отдавалось наиболее интересным для селекционеров образцам кукурузы.

По данным РВ-ПЦР анализируемые образцы четко разделились на две группы, значительно различающиеся по уровню экспрессии гена *LCYE* (см. рис. 4). Первая группа объединила четыре линии с высоким уровнем экспрессии (~0.018–0.037), который был в 4.5–370 раз выше, чем у десяти образцов второй группы (~0.0001–0.004). Среди четырех линий с высокой экспрессией три (образцы 6178-1, 6709-2 и 2289-3) несли аллель A2 и одна линия (образец 5677) – аллель A5. При этом уровень транскриптов *LCYE* в случае линии 5677 (A5) был в 1.5–2.0 раза ниже, чем у трех линий с аллелем A2 (см. рис. 4).

В группе линий с низкой экспрессией представлены все рассматриваемые аллельные варианты 5'-UTR *LCYE* (см. рис. 4). Интересно, что сюда вошли три взятых на анализ образца с аллелем A6 (МБК, 6097-1, 5254-3). На фоне общей низкой активности гена в этой группе была характерна повышенная активность *LCYE* для образцов линий 5580-1 и 645CZ (аллельный вариант A2) (см. рис. 4).

Отметим, что образцы линий, несущих аллельный вариант A2 или A5, присутствовали как в первой, так и во второй группе (см. рис. 4).

Таким образом, на примере 14 линий, представляющих все три варианта аллеля 5'-UTR *LCYE*, показано отсутствие какой-либо зависимости уровня транскриптов гена *LCYE* от аллеля (A2, A5 или A6) в фотосинтезирующей ткани листа проростков.

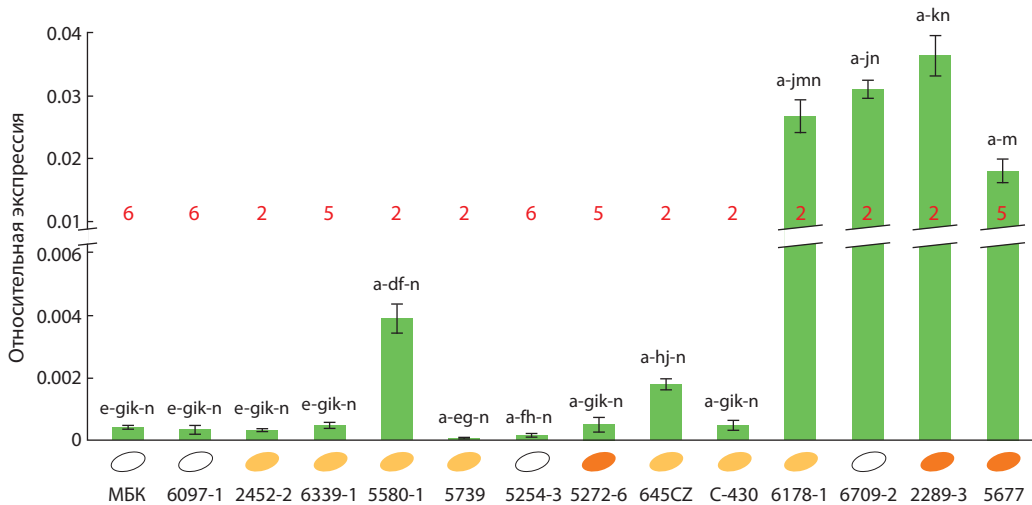


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *LCYE* в листовой ткани проростков образцов 14 инбредных линий кукурузы.

Буквами над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения экспрессии гена от значений для других образцов (образцам с 1-го по 14-й соответствуют буквы от а до п). Аллельный вариант (A2 – 2, A5 – 5, A6 – 6) указан красным шрифтом для каждого образца. Окраска зерен (белая, ярко-желтая или оранжевая) обозначена цветным эллипсом рядом с названием образца.

Обсуждение

В последние десятилетия одной из наиболее перспективных тенденций в селекции стала биофортификация (комплекс мер по улучшению питательных качеств культурных растений методами селекции с использованием ряда биотехнологий), направленная на обогащение съедобных частей растения микронутриентами (витамины, минеральные вещества и микроэлементы) (Medina-Lozano, Díaz, 2022). Такой подход в совокупности с молекулярными методами выявления родительских форм и анализа гибридного потомства позволил получить большое количество высокоурожайных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, в том числе гибридов кукурузы с высоким содержанием провитамина А (Pixley et al., 2013; Muthusamy et al., 2014; Liu et al., 2015; Menkir et al., 2017; Prasanna et al., 2020).

В этой связи интерес представляет молекулярный скрининг коллекций различных культур, который эффективен для определения аллельных вариантов генов, новых аллелей и сцепленности аллельных вариантов с морфофизиологическими признаками (Langridge, Fleury, 2011; Pasala, Pandey, 2020). С научной точки зрения совокупность получаемых результатов способствует более точному пониманию функции конкретных генов. Вместе с тем скрининг коллекций является важным этапом селекционной работы, так как дает возможность оценить представленность в селекционном материале конкретного аллельного варианта, определяющего искомый хозяйственно значимый признак, а также выявить доноров этого признака для введения в селекционный процесс (Langridge, Fleury, 2011).

В настоящей работе образцы 165 инбредных линий кукурузы отечественной селекции были охарактеризованы по аллельному варианту 5'-UTR гена *LCYE*. Активность ликопин-ε-циклазы считается обратной связанной с биоге-незом β-каротина и соответствующих β,β-ксантофиллов,

что, в свою очередь, определяет окраску зерна (бледно-желтая и оранжевая свидетельствуют о сдвиге в сторону β,ε- и β,β-ветвей соответственно, см. рис. 1) (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018). Снижение активности гена *LCYE* и, как следствие, значительные изменения соотношения β,ε- и β,β-каротиноидов тесно связаны с мутациями в области 5'-UTR гена, а именно со вставками мобильных элементов рядом с точкой инициации трансляции (аллели A1 и A4) (Harjes et al., 2008). Наибольшая эффективность накопления провитамина А в зерне сцеплена с аллелем A4 (Babu et al., 2013; Zunjare et al., 2018). С учетом этого разработаны молекулярные маркеры для определения различных аллельных вариантов последовательности 5'-UTR гена *LCYE* (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013). Скрининг коллекций *Z. mays* с помощью данных маркеров способствовал выявлению доноров аллеля A4, которые были введены в селекционные программы для получения линий и гибридов кукурузы с повышенным содержанием провитамина А (Harjes et al., 2008; Babu et al., 2013).

Проведенный нами анализ 165 инбредных линий не выявил образцов, несущих аллель A4, сцепленный с накоплением провитамина А. Это свидетельствует о том, что для биофортификации на повышенное содержание провитамина А следует привлекать иные источники, отличающиеся от образцов данной коллекции. Однако, кроме аллеля A2, скрининг позволил детектировать два других варианта последовательности данного участка 5'-UTR – аллель A5 (Архестова и др., 2023), а также ранее не описанный аллель A6 (см. рис. 3).

Далее мы протестировали возможность зависимости между вариантом аллеля 5'-UTR *LCYE* (A2, A5 или A6) и уровнем транскриптов гена *LCYE*. Для анализа были использованы фотосинтезирующие ткани проростков. Это объясняется тем, что, во-первых, известные исследования

гена *LCYE* кукурузы ограничены в основном данными по корреляции аллельных вариантов с содержанием каротиноидов в зерне, а во-вторых, наличие анализируемой корреляции могло бы послужить основой для выявления образцов кукурузы, являющихся донорами признака повышенного биосинтеза провитамина А в фотосинтезирующей ткани (силосе). В случае явной ассоциации какого-либо аллеля с уровнем экспрессии гена *LCYE* доноры этого аллеля могли бы быть использованы в селекции силосной кукурузы с повышенным содержанием провитамина А, что представляет интерес, учитывая популярность использования в РФ кукурузы на силос.

РВ-ПЦР была проведена на 14 образцах из 165 исследованных в данной работе. Среди этих 14 линий присутствовали все три варианта аллеля 5'-UTR *LCYE*: А2, А5 и А6. Поскольку в результате было показано отсутствие ассоциаций обнаруженных аллельных вариантов 5'-UTR *LCYE* с уровнем экспрессии *LCYE* в листе (см. рис. 4), можно предположить, что такой ассоциации нет и для всей проанализированной коллекции. Отсутствие искомой зависимости отчасти можно объяснить тем, что соотношение количества синтезируемых β,ε- и β,β-каротиноидов зависит от уровня экспрессии не только *LCYE*, но также гена ликопин-β-циклазы *LCYB* (Bai et al., 2009) или же других генов каротиногенеза, например генов фитоинсинтаз *PSY* (Орловская и др., 2016).

Данные РВ-ПЦР показали четкое разделение образцов на две группы – с высокой и низкой экспрессией *LCYE*. Принимая во внимание известную антиоксидантную роль ксантофиллов в фотозащите растения (Jahns, Holzwarth, 2012), можно предположить, что у десяти линий с низкой экспрессией *LCYE* (см. рис. 4) фотозащита осуществляется каротиноидами преимущественно основного ксантофиллового цикла (β,β-ветвь). В то же время у оставшихся четырех линий с высокой экспрессией *LCYE*, предположительно синтезирующих существенные количества β,ε-каротиноидов, такая защита может активно задействовать дополнительный лютеин-5,6-эпоксидный цикл (β,ε-ветвь).

Возможно также, что линии с низкой экспрессией *LCYE* (см. рис. 4) и предположительным смещением пути биосинтеза каротиноидов в сторону β,β-ветви синтезируют больше (в сравнении с линиями с высоким уровнем экспрессии гена) фитогормонов – стриголактонов и абсцизовой кислоты, получаемых при действии каротиноид-расщепляющих диоксигеназ (Dhar et al., 2020). Так, АБК образуется с помощью 9-*цис*-эпоксикаротиноид диоксигеназ *NCED* из 9-*цис*-виолаксантина и 9-*цис*-неоксантина (производных виолаксантина), а стриголактоны синтезируются при расщеплении β-каротина диоксигеназами *CCD* (Nambara, Marion-Poll, 2005; Cutler et al., 2010; Dhar et al., 2020). АБК играет решающую роль в приспособляемости растений, в том числе *Z. mays*, к различным условиям окружающей среды, опосредуя рост, развитие, стрессовый ответ и распределение питательных веществ (Huang et al., 2017; Yue et al., 2021). Стриголактоны принимают активное участие в стрессовом ответе растений (López-Ráez et al., 2010). С учетом сказанного предполагаемый повышенный синтез апокаротиноидов может свидетельствовать о большей адаптивности линий кукурузы с низкой экспрессией *LCYE* в вегетативной ткани.

Заключение

В настоящей работе проведен анализ вариантов аллеля 5'-UTR гена ликопин-ε-циклазы *LCYE* в геноме 165 инбредных линий кукурузы российской селекции. В результате выделены три группы образцов, несущих аллели А2 (64 линии), А5 (31) или А6 (70). Самый короткий из них, аллель А5, отличался одной и двумя делециями от А6 и А2 соответственно. Для оценки возможной зависимости уровня мРНК *LCYE* в листьях от аллельного варианта 5'-UTR была определена экспрессия гена у 14 линий, различающихся аллельными вариантами. На основании полученных данных можно утверждать отсутствие искомым ассоциаций. Мы полагаем, что линии кукурузы с низкой экспрессией гена *LCYE* могут послужить источником признаков повышенной стрессоустойчивости растений и усиления синтеза провитамина А в фотосинтезирующей ткани. При этом маркером будет не аллельный вариант 5'-UTR *LCYE*, а уровень экспрессии гена *LCYE*. Подтверждение достоверности такой возможности потребует дальнейших исследований на большем количестве образцов.

Список литературы / References

- Архестова Д.Х., Кулакова А.В., Хатефов Э.Б., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Экспрессия гена ликопин-ε-циклазы *LcyE* коррелирует с содержанием β-каротина и хлорофиллов в вегетативной ткани кукурузы. *С.-х. биология*. 2022;57(5):945-953. DOI 10.15389/agrobiol.2022.5.945rus.
- [Arkhestova D.Kh., Kulakova A.V., Khatefov E.B., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Expression of the lycopene-ε-cyclase *LcyE* gene correlates with the content of β-carotene and chlorophylls in maize vegetative tissues. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2022;57(5):945-953. DOI 10.15389/agrobiol.2022.5.945rus. (in Russian)]
- Архестова Д.Х., Ефремов Г.И., Аппаев С.П., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Новый аллель 5'-UTR *LcyE* коррелирует с повышенной экспрессией гена ликопин-ε-циклазы, определяющей поток ветви β-ε пути биосинтеза каротиноидов у кукурузы. *Генетика*. 2023;59(4):417-424. DOI 10.31857/S0016675823030025.
- [Arkhestova D.Kh., Efremov G.I., Appaev S.P., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. A new 5'-UTR *LcyE* allele correlates with increased expression of the lycopene-ε-cyclase gene determining the flow of the β-ε branch of the carotenoid biosynthesis pathway in maize. *Genetika = Genetics*. 2023;59(4):417-424. DOI 10.31857/S0016675823030025. (in Russian)]
- Орловская О.А., Вакула С.И., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. Ассоциация уровня общего содержания каротиноидов в зерне кукурузы (*Zea mays* L.) с аллельным полиморфизмом сайта InDel1 гена *PSY1*. *Экол. генетика*. 2016;14(3):28-34. DOI 10.17816/ecogen14328-34.
- [Orlovskaya O.A., Vakula S.I., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. Association of total carotenoid level in maize grain (*Zea mays* L.) with polymorphic site InDel1 in *PSY1* gene. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2016;14(3):28-34. DOI 10.17816/ecogen14328-34. (in Russian)]
- Филиюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз перца (*Capsicum* spp.) и их роль в биосинтезе антоцианов. *Генетика*. 2023; 59(5):517-529. DOI 10.31857/S0016675823050041.
- [Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Anthocyanin content in the *Capsicum* species fruits correlates with expression levels of flavonoid pathway structural and regulatory genes. *Russ. J. Plant Physiol*. 2023;70:4. DOI 10.1134/S1021443722602324.]
- Babu R., Rojas N.P., Gao S., Yan J., Pixley K. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on pro-

- vitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126:389-399. DOI 10.1007/s00122-012-1987-3.
- Bai L., Kim E.H., DellaPenna D., Brutnell T.P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J.* 2009;59(4):588-599. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2009.03899.x.
- Cabiddu A., Delgadillo-Puga C., Decandia M., Molle A.G. Extensive ruminant production systems and milk quality with emphasis on unsaturated fatty acids, volatile compounds, antioxidant protection degree and phenol content. *Animals (Basel).* 2019;9(10):771. DOI 10.3390/ani9100771.
- Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010;61:651-679. DOI 10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
- Dhar M.K., Mishra S., Bhat A., Chib S., Kaul S. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism. *Brief. Funct. Genomics.* 2020;19(1):1-9. DOI 10.1093/bfpg/elz037.
- Graulet B., Cirić C., Martin B. Contrasted effects of dietary extruded linseed supplementation on carotenoid and liposoluble vitamin status in lactating Holstein or Montbéliarde cows fed hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 2019;102(7):6210-6225. DOI 10.3168/jds.2018-16138.
- Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L., Brutnell T.P., Kandianis C.B., Sowinski S.G., Stapleton A.E., Vallabhaneni R., Williams M., Wurtzel E.T., Yan J., Buckler E.S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science.* 2008;319(5861):330-333. DOI 10.1126/science.1150255.
- Huang X., Shi H., Hu Z., Liu A., Amombo E., Chen L., Fu J. ABA is involved in regulation of cold stress response in Bermudagrass. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1613. DOI 10.3389/fpls.2017.01613.
- Jahns P., Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1817(1):182-193. DOI 10.1016/j.bbabi.2011.04.012.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(7):1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Langridge P., Fleury D. Making the most of 'omics' for crop breeding. *Trends Biotechnol.* 2011;29(1):33-40. DOI 10.1016/j.tibtech.2010.09.006.
- LaPorte M.F., Vachev M., Fenn M., Diepenbrock C. Simultaneous dissection of grain carotenoid levels and kernel color in biparental maize populations with yellow-to-orange grain. *G3: Genes Genomes Genetics (Bethesda).* 2022;12(3):jkac006. DOI 10.1093/g3journal/jkac006.
- Li F., Vallabhaneni R., Yu J., Rocheford T., Wurtzel E.T. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol.* 2008;147(3):1334-1346. DOI 10.1104/pp.108.122119.
- Liu L., Jeffers D., Zhang Y., Ding M., Chen W., Kang M.S., Fan X. Introgression of the *crTRB1* gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers. *Mol. Breed.* 2015;35(8):154. DOI 10.1007/s11032-015-0349-7.
- López-Ráez J.A., Kohlen W., Charnikhova T., Mulder P., Undas A.K., Sergeant M.J., Verstappen F., Bugg T.D.H., Thompson A.J., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytol.* 2010;187(2):343-354. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03291.x.
- Medina-Lozano I., Díaz A. Applications of genomic tools in plant breeding: crop biofortification. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(6):3086. DOI 10.3390/ijms23063086.
- Menkir A., Maziya-Dixon B.B., Mengesha W., Rocheford T., Alamu E.O. Accruing genetic gain in pro-vitamin A enrichment from harnessing diverse maize germplasm. *Euphytica.* 2017;213(5):105. DOI 10.1007/s10681-017-1890-8.
- Mitani T., Kobayashi K., Ueda K., Kondo S. Regional differences in the fatty acid composition, and vitamin and carotenoid concentrations in farm bulk milk in Hokkaido, Japan. *J. Anim. Sci.* 2021;92(1):e13570. DOI 10.1111/asj.13570.
- Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N., Choudhary M., Saha S., Bhat J.S., Prasanna B.M., Gupta H.S. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele. *PLoS One.* 2014;9(12):e11583. DOI 10.1371/journal.pone.0113583.
- Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005;56:165-185. DOI 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046.
- Pasala R., Pandey B.B. Plant phenomics: high-throughput technology for accelerating genomics. *J. Biosci.* 2020;45:111. DOI 10.1007/s12038-020-00083-w.
- Pixley K., Rojas N.P., Babu R., Mutale R., Surlis R., Simpungwe E. Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In: Tanumihardjo S.A. (Ed.) Carotenoids and Human Health. Nutrition and Health. Totowa, NJ: Humana Press, 2013;271-292. DOI 10.1007/978-1-62703-203-2_17.
- Prasanna B.M., Palacios-Rojas N., Hossain F., Muthusamy V., Menkir A., Dhliwayo T., Ndhlela T., San Vicente F., Nair S.K., Vivek B.S., Zhang X., Olsen M., Fan X. Molecular breeding for nutritionally enriched maize: status and prospects. *Front. Genet.* 2020;10:1392. DOI 10.3389/fgene.2019.01392.
- Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. In: Stange C. (Ed.) Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry. Vol. 79. Cham: Springer, 2016;35-69. DOI 10.1007/978-3-319-39126-7_2.
- Suwarno W.B., Hannok P., Palacios-Rojas N., Windham G., Crossa J., Pixley K.V. Provitamin A carotenoids in grain reduce aflatoxin contamination of maize while combating vitamin A deficiency. *Front. Plant Sci.* 2019;10:30. DOI 10.3389/fpls.2019.00030.
- Trono D. Carotenoids in cereal food crops: composition and retention throughout grain storage and food processing. *Plants (Basel).* 2019;8(12):551. DOI 10.3390/plants8120551.
- Yan J., Kandianis B.C., Harjes E.C., Bai L., Kim E.H., Yang X., Skinner D.J., Fu Z., Mitchell S., Li Q., Fernandez M.G., Zaharieva M., Babu R., Fu Y., Palacios N., Li J., Dellapenna D., Brutnell T., Buckler E.S., Warburton M.L., Rocheford T. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases beta carotene in maize grain. *Nat. Genet.* 2010;42(4):322-327. DOI 10.1038/ng.551.
- Yue K., Lingling L., Xie J., Coulter J.A., Luo Z. Synthesis and regulation of auxin and abscisic acid in maize. *Plant Signal. Behav.* 2021;16(7):1891756. DOI 10.1080/15592324.2021.1891756.
- Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F., Hossain F., Baveja A., Muthusamy V., Gupta H.S. Molecular characterization of 5' UTR of the *lycopene epsilon cyclase (lcyE)* gene among exotic and indigenous inbreds for its utilization in maize biofortification. *3 Biotech.* 2018;8(1):75. DOI 10.1007/s13205-018-1100-y.

ORCID ID

D.Kh. Arkhestova orcid.org/0000-0003-1239-3641
A.V. Shchennikova orcid.org/0000-0003-4692-3727
E.Z. Kochieva orcid.org/0000-0002-6091-0765

Благодарности. Работа выполнена при поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ «Аграрная наука – шаг в будущее развитие АПК».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.02.2023. После доработки 12.05.2023. Принята к публикации 12.05.2023.

Seedling and adult plant resistance to leaf rust in some Bulgarian common wheat lines

V. Ivanova

Agricultural Academy, Dobrudzha Agricultural Institute, General Toshevo, Republic of Bulgaria
✉ vkiryakova@yahoo.com

Abstract. The response of 250 common winter wheat breeding lines was investigated for resistance to the causative agent of *Puccinia triticina* under conditions of an infected field on the territory of Dobrudzha Agricultural Institute – General Toshevo, Bulgaria, during three successive seasons. Twenty lines with different degrees of resistance under field conditions were selected. Multi-pathotype testing was used to study the response of these lines at seedling stage under greenhouse conditions to individual pathotypes of *P. triticina*. Based on the response of the lines at seedling and adult stages, we found out that 20 % of them carried race-specific resistance. One of the lines (99/08-52) reacted with full resistance to the pathotypes used under greenhouse conditions. The reaction demonstrated by this line coincided with the response of isogenic lines carrying the genes *Lr9*, *Lr19*, *Lr22a*, *Lr22b* and *Lr25*. The other three lines (19/06-108, 82/08-43 and 82/08-35) showed a resistant reaction to 6 or 5 of the pathotypes used in the study. Their response partially coincided with the reaction of 5 isogenic lines, and the presence of some of these genes in the above lines is quite possible. Lines carrying this type of resistance are to be subjected to further genetic and breeding investigations to prove the presence of a race-specific gene. Twenty-five percent of the lines combined partial race-specific resistance at seedling stage with the resistance of race non-specific nature at adult stage. Forty percent of all studied lines carried race non-specific resistance, and 15 % of the lines possessed resistance of the “*slow rusting*” type. As a result of the study we carried out, the lines that demonstrated stable resistance to leaf rust can provide sufficient protection of the host and can be included in the breeding programs for developing varieties resistant to *P. triticina*.

Key words: wheat; *Puccinia triticina*; pathotypes; adult and juvenile resistance.

For citation: Ivanova V. Seedling and adult plant resistance to leaf rust in some Bulgarian common wheat lines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):447-453. DOI 10.18699/VJGB-23-54

Устойчивость проростков и взрослых растений к бурой ржавчине у некоторых линий болгарской мягкой пшеницы

В. Иванова

Сельскохозяйственная академия, Добруджанский сельскохозяйственный институт, Генерал Тошево, Республика Болгария
✉ vkiryakova@yahoo.com

Аннотация. Проверена реакция 250 селекционных линий мягкой озимой пшеницы на устойчивость к возбудителю *Puccinia triticina* в условиях инфекционного поля на территории Добруджанского сельскохозяйственного института (Генерал Тошево, Болгария) в течение трех сезонов. Отобрано 20 линий с разной степенью устойчивости в полевых условиях. Для изучения реакции этих линий на стадии проростков в тепличных условиях на отдельные патотипы *P. triticina* использовали мультипатотипное тестирование. По реакции линий на стадии проростков и взрослых растений установлено, что 20 % из них обладают расоспецифической устойчивостью. Одна из линий (99/08-52) проявила полную устойчивость к патотипам, используемым в тепличных условиях. Ее реакция совпала с реакцией изогенных линий – носителей генов *Lr9*, *Lr19*, *Lr22a*, *Lr22b* и *Lr25*. Еще три линии (19/06-108, 82/08-43 и 82/08-35) показали резистентную реакцию на шесть или пять патотипов, использованных в исследовании. Их реакция частично совпала с реакцией пяти изогенных линий. Вероятно, некоторые из этих генов присутствуют у перечисленных выше линий. Линии-носители данного типа устойчивости подлежат дальнейшим генетико-селекционным исследованиям для подтверждения наличия расоспецифического гена. У 25 % линий частичная расоспецифическая устойчивость на стадии проростков сочеталась с устойчивостью расовой неспецифической природы на взрослой стадии. Из всех изученных линий 40 % обладали расовой неспецифической устойчивостью, а 15 % – устойчивостью типа *slow rusting*. По результатам наших исследований, линии, показавшие стабильную устойчивость к бурой ржавчине, могут быть включены в селекционные программы по созданию сортов, устойчивых к *P. triticina*.

Ключевые слова: пшеница; *Puccinia triticina*; патотипы; ювенильная и возрастная устойчивость.

Introduction

Leaf rust is one of the most widespread diseases on wheat in Bulgaria and one of the most important diseases in those parts of the world, where wheat is the main cereal crop. The development and growing of resistant cultivars is an important, efficient, environmentally friendly and cost-effective method for control of the disease (Bariana, 2003; Bariana et al., 2007; Singh et al., 2016; Volkova et al., 2020; Kokhmetova et al., 2021). In order to avoid the danger of epiphytotic occurrence, it is necessary to have at our disposal a large number of sources – carriers of different genes or types of resistance, which should be properly alternated in the production fields (Donchev et al., 1977). According to Van der Plank (1963), the resistance can be categorized into two classes based on the genetic control and the phenotypic effect – race specific (vertical) and race non-specific (horizontal).

The specific resistance is determined by one or several genes acting independently of one another and is efficient to individual races of the pathogen (Roelfs et al., 1992). Each gene ensures resistance to all races that do not have a respective gene for virulence, but not to races that do not possess such a gene. When this resistance is realized in a widely distributed cultivar, high selection pressure on the pathogen occurs, leading to the formation of new races with new genes for virulence, i. e. this type of resistance quickly loses its efficiency, because the pathogen population evolves (Huerta-Espino et al., 2011, 2014; Lowe et al., 2011; Ellis et al., 2014).

The non-specific (horizontal) resistance ensures protection of the plants against all races of the pathogen and the genes, which determine it, have additive effect. The polygenic nature of this type of resistance is the reason for its durability (Parlevliet, Zadoks, 1977; Singh et al., 2011). It is expressed at adult stage and its mechanism consists in reduction in the amount and rate of the disease (Stubbs et al., 1986; Li et al., 2014). The impact of the qualitative resistance of the host on the evolution of the pathogen populations is less documented in the literature (Volkova et al., 2020). It has been shown that the fungal pathogens may evolve and adapt to qualitative resistance through breeding for higher aggressiveness (Delmas et al., 2016; Frézal et al., 2018).

Especially interesting is the resistance of a non-specific nature – the “*slow rusting*” type, or the retarded development of the pathogen. The cultivars possessing this type of resistance allow the pathogen to sporulate on them, to attack them to a moderate degree, without forcing the pathogen to develop new more aggressive races (Knott, 1989; Kolmer, 2013; Singh et al., 2016). The genes determining this type of resistance are related to such factors as pustule size, infection frequency, latent period, and are most often defined as “*slow rusting genes*” (Caldwell, 1968; Kolmer, 1996; Ellis et al., 2014). Although the genes determining adult stage resistance are considered to determine durable resistance, some authors point out that the occurrence of new and aggressive races of the pathogen may make these genes inefficient (Singh, Rajaram, 1992; Park, McIntosh, 1994; Huerta-Espino, Singh, 1996). This is the reason why it is necessary to search for and develop new sources of resistance (Pathan, Park, 2006; Ivanova, 2015; Ivanova, Chamurliisky, 2017; Ivanova et al., 2019a, b). Hussain et al. (1999) concluded that durable rust

resistance mechanism in wheat is achieved through incorporation of partially resistant minor genes, which seems to be more appropriate for sustainable wheat production.

The method based on the “gene for gene” relation is one of the fundamental concepts of the relationship between the plants and the pathogens (Flor, 1956). Based on this hypothesis, Person (1959) developed a method for identification of genes for resistance with the help of testing races of the pathogen, which carry certain virulence. The multipathotype test used for determining the sources of resistance at seedling stage by comparing the response of the tested sources to the reaction of the isogenic lines allows investigating a large number of sources and the obtained information can be used for the development of resistant cultivars. The gene postulation, determined through the multipathotype test, is the most widely applied method worldwide for proving the presence of race specificity and for identification of certain *Lr* genes in different wheat populations (Statler, 1984; Modawi et al., 1985; Singh, Gupta, 1991; Singh, 1993; Singh et al., 1999; Oelke, Kolmer, 2004; Gebrewahid et al., 2017; Yan et al., 2017; Zhang et al., 2019; Wu et al., 2020). The multipathotype test, however, has certain shortcomings. Kadkhodaei et al. (2012) pointed out that the identification of *Lr* genes is rather labor and time consuming. Furthermore, there may be no available pathotypes suitable for identification of the genes for resistance present in the genotypes, or the pathotype may not be able to detect the genes for resistance to rust.

Starting from these premises and estimating the difficulties and disadvantages of the use of the multipathotype test, our investigation, too, could not achieve complete and thorough identification of a gene, but only a suggestion; on the basis of the response of these lines at seedling and adult stages, however, the nature of the resistance was determined, which also provides valuable data that can aid the breeding and improvement work for development of cultivars resistant to the disease.

The aim of this investigation was to study the response of common winter wheat lines both at seedling and adult stages and to use the obtained data on stable resistance present in these lines to aid the breeding for development of cultivars resistant to *Puccinia triticina*.

Materials and methods

In the infection field of Dobrudzha Agricultural Institute – General Toshevo, Bulgaria, the reaction to leaf rust (*P. triticina*) of 250 lines of common winter wheat involved in a competitive varietal trial was studied. From the investigated breeding material, 20 lines were selected, which responded with a certain degree of resistance from moderate to high (MR–VR), and which demonstrated resistant reaction to some of the used pathotypes of *P. triticina* at seedling stage under greenhouse conditions.

Seedling test. The selected 20 lines were tested for resistance to single pathotypes of *P. triticina* and their response was compared to the reaction of a set of 34 differential lines (isogenic lines developed on the basis of cultivar Thatcher and each carrying one of the already identified *Lr* genes) according to the 7 pathotypes used in the study, which possessed different virulence (13763, 33762, 43773, 53723, 53762, 73762, and

73763). The pathotypes used in the test were identified on the basis of the reaction of 15 monogenic lines, *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr11*, *Lr15*, *Lr17*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26* and *Lr28*, coded for by the method of Limpert and Müller (1994). Avirulence/virulence profiles of *P. triticina* pathotypes are present in Table 1.

The inoculated plants were placed in the dark in a moist chamber at temperature 18–20 °C and 100 % relative air humidity. After 24 hours at these conditions, they were transferred to a greenhouse for further growing under controlled conditions: 20–25 °C (day) and 15 °C (night), more than 75 % relative air humidity and 30,000 lx light intensity, for elongation of the photo period – 16 h (day) and 8 h (night).

In order to improve sporulation, the plants were treated with maleic hydrazide 97 % solution (1 g in 3 l water). On the 9–12th day after inoculation, the type of reaction (R) was read according to the scale of Stakman et al. (1962).

Infection types 0, 0₁, 1 and 2 were considered expression of a resistant type of reaction (R), while infection types 3, 4 and X were considered susceptible (S) while estimating the disease.

Adult plant test. The investigation was carried out under conditions of a maximum infection created in the field, where the full set of pathotypes identified for the respective year were taken out. The lines were planted manually in 1.5 m wide rows with 0.25 m interspacing, in two replications. Cultivar *Michigan amber* was used as a multiplier and distributor of leaf rust. Spreader rows of *M. amber* were planted perpendicular and adjacent to the test rows. The artificial inoculation with the pathogen was done according to the methodology for working with rusts adopted at the Plant Pathology Laboratory of Dobrudzha Agricultural Institute (Ivanova, 2012). Nine-day old seedlings from the standard susceptible cultivar *M. amber* inoculated with different pathotypes of *P. triticina* were planted in the rows of the spreader cultivar in March and April till the final accumulation of inoculum in June, when the maximum was reached. The type of infection and the attacking rate were read according to the scale of Cobb, modified by Peterson (Peterson et al., 1948) at milk maturity stage. The average coefficient of infection (ACI), or the so called corrected relative attack rate (P_0), was calculated by introducing a coefficient for the respective infection types (R – 0.2; MR – 0.4; M – 0.6; MS – 0.8; S – 1). Depending on the values of ACI, the studied lines were divided into several groups: immune (ACI = 0); very resistant, VR (ACI = 0–5.99); resistant, R (ACI = 6–25.99); moderately resistant, MR (ACI = 26–45.99); moderately susceptible, MS (ACI = 46–65.99); susceptible, S (ACI = 66–100). The lines with susceptible reaction were of no interest to us.

Results and discussion

The experiment was carried out in three successive vegetative growth seasons. Out of the investigated 250 common winter wheat lines, 20 lines were selected, which responded with high to moderate resistance over the years of study. The lines responding with MR probably carry *slow-rusting* genes. According to Morgunov et al. (2010), some genes with *slow-rusting* effect have a moderately susceptible type of infection but their attack rate does not exceed 50 %. The response of the lines investigated under field conditions is presented in

Table 1. Avirulence/virulence profiles of *Puccinia triticina* pathotypes

Race/ Pathotypes	Avirulence/virulence spectrum (effective <i>Lr</i> genes) / (ineffective <i>Lr</i> genes)
13763	<i>Lr2a</i> , <i>2b</i> , 9, 19, 28 / <i>Lr1</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 23, 24, 26
33762	<i>Lr2b</i> , 9, 19, 24, 28 / <i>Lr1</i> , <i>2a</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 23, 26
43773	<i>Lr1</i> , <i>2a</i> , 9, 19, 28 / <i>Lr2b</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 23, 24, 26
53723	<i>Lr2a</i> , 9, 19, 23, 28 / <i>Lr1</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 24, 26
53762	<i>Lr2a</i> , 9, 19, 24, 28 / <i>Lr1</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 23, 26
73762	<i>Lr9</i> , 19, 24, 28 / <i>Lr1</i> , <i>2a</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 23, 26
73763	<i>Lr9</i> , 19, 28 / <i>Lr1</i> , <i>2a</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , 3, 11, 15, 17, 21, 23, 24, 26

Table 2, and the reaction of the lines at seedling stage to seven separate *P. triticina* pathotypes of different virulence is given in Table 3. The results of the investigation revealed the following.

Line 60/05-49 at seedling stage exhibited a resistant reaction to four phenotypically different pathotypes (see Table 3), and the field evaluation showed that this line had a resistant to very resistant reaction (see Table 2). This allows us to comment that the line is a carrier of partial race-specific resistance in combination with resistance of non-specific nature, but the race-specific resistance has to be checked at a later stage.

Line 15/05-82 demonstrated a susceptible reaction to all pathotypes of the pathogen used under greenhouse conditions, and the field evaluation showed that the line responded with a very resistant to resistant reaction. According to this reaction exhibited at seedling and adult stages, the line can be defined as a carrier of adult or field resistance.

Line 60/05-68, also at seedling stage, responded with a susceptible reaction to all pathotypes used in the study, and the field evaluation showed a resistant to moderately resistant reaction. The response of the line allowed referring it to the group of the carriers of the *slow rusting* type of resistance.

Line 20/05-120 at seedling stage responded with a susceptible reaction to all used pathotypes, and in the field it exhibited resistance of the type (VR–R–MR), but judging by the reaction, this line can be referred to the group of lines carrying resistance of race non-specific nature.

Line 98/05-95 at seedling stage demonstrated a resistant reaction to two pathotypes (33762 and 53762), and the field evaluation was not constant; in 2014, when the attack on cultivar *M. amber* was even higher in comparison to the other two years, the lines responded as moderately susceptible. In 2015 and 2016, the line demonstrated a resistant to moderately resistant reaction. This line carried resistance of race non-specific nature.

Line 223/05-2 responded with a resistant reaction to three pathotypes under greenhouse conditions and with complete resistance at adult stage. The line was a carrier of partial race-specific resistance in combination with race non-specific one.

Line 13/08-87 at seedling stage responded with a resistant reaction to only one pathotype (53762), and its field resistance was of the VR–R type. The line was a carrier of resistance of race non-specific nature.

Table 2. Adult plant resistance

Cultivar/ Lines	2014			2015			2016		
	Final rust severity	ACI	Rating	Final rust severity	ACI	Rating	Final rust severity	ACI	Rating
60/05-49	10/4	12.5	R	0	0	VR	5/4	7.1	R
15/05-82	15/4	18.8	R	0	0	VR	0	0	VR
60/05-68	25/4	31.3	MR	25/4	37.6	MR	10/4	14.3	R
20/05-120	0	0	VR	25/4	37.6	MR	5/4	7.1	R
98/05-95	40/4	50.0	MS	25/4	37.6	MR	5/4	7.1	R
223/05-2	0	0	VR	0	0	VR	0	0	VR
19/06-108	10/4	12.5	R	5/4	7.1	R	5/4	7.1	R
13/08-87	0	0	VR	10/4	14.3	R	0	0	VR
44/08-66	25/4	31.3	MR	25/4	37.6	MR	5/4	7.1	R
19/08-28	0	0	VR	0	0	VR	0	0	VR
18/08-16	5/4	6.3	R	10/4	14.3	R	0	0	VR
14/08-57	10/4	12.5	R	5/4	7.1	R	5/4	7.1	R
44/08-88	40/4	50.0	MS	5/4	7.1	R	5/4	7.1	R
46/08-27	5/4	6.3	R	5/4	7.1	R	5/4	7.1	R
79/08-10	0	0	VR	5/4	7.1	R	0	0	VR
72/08-23	0	0	VR	5/4	7.1	R	5/4	7.1	R
82/08-35	5/4	6.3	R	0	0	VR	5/4	7.1	R
82/08-43	5/4	6.3	R	5/4	7.1	R	10/4	14.3	R
90/08-22	0	0	VR	5/4	7.1	R	0	0	VR
99/08-52	25/4	31.3	MR	5/4	7.1	R	10/4	14.3	R
<i>M. amber</i>	80/4	100	VS	70/4	100	VS	70/4	100	VS

Table 3. Response of common winter wheat lines
to 7 pathotypes of *P. tritricina* at seedling stage

Cultivar/ Lines	<i>P. tritricina</i> pathotypes						
	13763	33762	43773	53762	73762	53723	73763
60/05-49	R	R	S	S	R	R	S
15/05-82	S	S	S	S	S	S	S
60/05-68	S	S	S	S	S	S	S
20/05-120	S	S	S	S	S	S	S
98/05-95	S	R	S	R	S	S	S
223/05-2	S	R	R	S	S	R	S
19/06-108	R	R	R	R	R	R	S
13/08-87	S	S	S	R	S	S	S
44/08-66	S	S	R	S	S	S	R
19/08-28	S	R	R	S	S	R	S
18/08-16	S	R	S	S	R	R	S
14/08-57	S	R	S	R	S	S	S
44/08-88	S	S	S	S	S	S	S
46/08-27	S	S	S	S	S	R	S
79/08-10	S	R	S	S	S	R	S
72/08-23	R	R	S	R	S	R	S
82/08-35	S	R	R	R	S	R	R
82/08-43	S	R	R	R	S	R	R
90/08-22	S	S	S	S	S	R	S
99/08-52	R	R	R	R	R	R	R
<i>M. amber</i>	S	S	S	S	S	S	S

Line 44/08-66 responded with a resistant reaction at seedling stage to two pathotypes (43773 and 73763), and during two of the years it demonstrated field resistance of the MR type. Based on the response of the line, it was referred to the group of lines of the *slow rusting* type.

Line 18/08-16 as well as line 19/08-28 responded with a resistant reaction at seedling stage to three of the pathotypes and demonstrated R to VR under field conditions, allowing us to refer them to the group of lines combining partial race-specific resistance with race non-specific one. The combination of these two types of resistance in a single genotype is a good solution for breeding since the host is protected against diseases during the entire vegetative growth season.

Line 14/08-57 demonstrated stable field resistance and a resistant reaction to two of the pathotypes under greenhouse conditions. The line was a carrier of race non-specific resistance.

Line 46/08-27 reacted with stable resistance in the field during the three years of testing, and at seedling stage, it demonstrated a resistant reaction to only one pathotype. The line carries resistance of race non-specific nature.

Line 79/08-10 responded at seedling stage with a resistant reaction to two pathotypes (33762 and 53723), and in the field it demonstrated a resistant to very resistant reaction. The line is a carrier of race non-specific resistance.

Line 72/08-23 showed a resistant to very resistant reaction in the field, and under greenhouse conditions, a resistant reaction to four pathotypes was registered. The line is a carrier of partial race-specific resistance in combination with race non-specific one.

Table 4. Comparative reaction between four breeding lines and the isogenic lines carrying genes *Lr9*, *Lr19*, *Lr22a*, *Lr22b* and *Lr25*, determining resistance to pathotypes of leaf rust

<i>Lr</i> gene/Line	Year	13763	33762	43773	53762	73762	53723	73763
<i>Lr22a</i>	2014	R	R	R	R	R	R	R
<i>Lr22b</i>	2014	R	R	R	R	R	R	R
<i>Lr25</i>	2014	R	R	R	R	R	R	R
<i>Lr9</i>	2015–2016	R	R	R	R	R	R	R
<i>Lr19</i>	2015–2016	R	R	R	R	R	R	R
99/08-52	2014–2016	R	R	R	R	R	R	R
19/06-108	2014–2016	R	R	R	R	R	R	S
82/08-35	2014–2016	S	R	R	R	S	R	R
82/08-43	2014–2016	S	R	R	R	S	R	R

Line 90/08-22 exhibited a resistant to very resistant reaction in the field, while responding with a resistant reaction to only one pathotype at seedling stage. This line is probably a carrier of adult race specific resistance or resistance of race non-specific nature.

Line 99/08-52 responded with a resistant reaction to all 7 pathotypes used in this study, and the field evaluation was within the range of R–MR. The presence of full resistance at seedling stage was a proof that the line possessed race-specific resistance. Its reaction coincided entirely with the reaction of the isogenic lines carrying genes *Lr9*, *Lr19*, *Lr22a*, *Lr22b* and *Lr25* (Table 4).

According to data provided by Ivanova (2020) and Ivanova et al. (2021), in 2014, with 100 % efficiency against the local population of *P. triticina* there were genes *Lr22a*, *Lr22b* and *Lr25*, and in 2015 and 2016, also with 100 % efficiency, genes *Lr9* and *Lr19* were registered. Potentially, any of these genes could be present, determining the resistance of these lines to *P. triticina* (see Table 4). For greater precision, we recommend conducting breeding and genetic studies in order to prove the presence of some of these genes in the above line. Another three lines showed a similar reaction: 19/06-108 responded with susceptibility to pathotype 73763, and lines 82/08-35 and 82/08-43 demonstrated a susceptible reaction to pathotypes 13763 and 73762. To all other pathotypes, the lines responded with resistance.

Since the reaction of the lines partially coincided with the reaction of the above mentioned isogenic lines, it can be suggested that these breeding lines could also carry some of these genes (see Table 4).

Conclusion

As a result of this study, we identified the following types of resistance in the investigated lines:

- Lines with race-specific resistance, which are to be subjected to breeding and genetic studies to prove the presence of the race-specific gene – four of the lines probably carried this type of resistance: 19/06-108, 99/08-52, 82/08-35 and 82/08-43. They constituted 20 % of all investigated lines.
- Lines combining partial race-specific resistance at seedling stage with resistance of race non-specific nature at adult stage. The combination of race-specific with race non-

specific resistance is a good possibility to protect the host against the disease during the entire vegetative growth. The lines that fall in this group are 60/05-49, 223/05-2, 19/08-28, 18/08-16, 72/08-23. They constituted 25 % of the investigated lines.

- Lines-carriers of race non-specific resistance. The non-specific nature of resistance is determined by the fact that at adult age, the host is resistant to all races and in this case the resistance is determined by 4 or 5 small genes with additive effect. Lines 15/05-82, 98/05-95, 14/08-57, 46/08-27, 79/08-10, 90/08-22, 44/08-88 and 13/08-87 fell in this group. They constituted 40 % of all studied lines.
- Lines-carriers of the *slow rusting* type of resistance: lines 20/05-120, 44/08-66 and 60/05-68 belonged to this group and they constituted 15 % of the investigated material. The partial resistance is more durable than the resistance conditioned by single main genes since it is inherited polygenically (Parlevliet, 1985).

The lines studied in this investigation are carriers of certain types of resistance. According to Volkova et al. (2020), the cultivars with race-specific resistance are applied as a mosaic of varieties with subsequent alternation over time and space, and the cultivars that carry non-specific resistance can be used on large areas for a longer period of time in combination with cultivars from different groups, including their own.

In this relation, the studied lines carrying race-specific or race non-specific resistance can be included in the breeding programs for developing resistant cultivars in order to avoid large yield losses caused by the disease.

References

- Bariana H.S. Breeding for disease resistance. In: Thomas B., Murphy D.J., Murray B.G. (Eds.) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Harcourt, Acad. Press, 2003;244-253.
- Bariana H.S., Brown G.N., Bansal U.K., Miah H., Standen G.E., Lu M. Breeding triple rust resistant wheat cultivars for Australia using conventional and marker-assisted selection technologies. *Aust. J. Agric. Res.* 2007;58(6):576-587. DOI 10.1071/AR07124.
- Caldwell R.M. Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In: Finlay K.W., Shepherd K.W. (Eds.) *Proceeding of the Third International Wheat Genetics Symposium*. Canberra (Australia), Australian Academy of Sciences, 1968;263-272.

- Delmas C.E.L., Fabre F., Jolivet J., Mazet I.D., Cervera S.R., Delière L., Delmotte F. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evol. Appl.* 2016;9(5):709-725. DOI 10.1111/eva.12368.
- Donchev N., Todorov I., Malinski K. Immunological characterization of some common wheat cultivars. In: *Breeding and Agrotechnical of Wheat and Sunflower*. Praha, 1977;81-96. (in Bulgarian)
- Ellis J.G., Lagudah E.S., Spielmeier W., Dodds P.N. Past, present and future of breeding rust-resistance wheat. *Front. Plant Sci.* 2014;5: 641. DOI 10.3389/fpls.2014.00641.
- Flor H.H. The complementary genetics system in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 1956;8:29-54. DOI 10.1016/S0065-2660(08)60498-8.
- Frézal L., Jacqua G., Neema C. Adaptation of a fungal pathogen to host quantitative resistance. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1554. DOI 10.3389/fpls.2018.01554.
- Gebrewahid T.W., Yao Z.-J., Yan X.-C., Gao P., Li Z.-F. Identification of leaf rust resistance genes in Chinese common wheat cultivars. *Plant Dis.* 2017;101(10):1729-1737. DOI 10.1094/PDIS-02-17-0247-RE.
- Huerta-Espino J., Singh R.P. Misconceptions on the durability of some adult plant resistance genes in wheat. In: *Proceeding 9th European and Mediterranean Cereal Rust and Powdery Mildew Conf.* Lunteren. The Netherlands, 1996;109-111.
- Huerta-Espino J., Singh R.P., Germán S., McCallum B.D., Park R.F., Chen W.Q., Bhardwaj S.C., Goyeau H. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica.* 2011;179:143-160. DOI 10.1007/s10681-011-0361-x.
- Huerta-Espino J., Singh R.P., Roelfs A.P. Rusts fungi of wheat. In: Misra J.K., Tewari J.P., Deshmukh S.K., Vágvölgyi C. (Eds.) *Fungi from Different Substrates*. Florida (USA): CRC Press, 2014;217-259. DOI 10.1201/b17646.
- Hussain M.H., Chaudhry A., Rehman J., Anwar S.B. Development of durable rust resistance in wheat. *Pakistan J. Phytopathol.* 1999; 11:130-139.
- Ivanova V. Studies on the resistance of common wheat and other species to the cause agent of brown rust *Puccinia triticina* Erikss. PhD thesis. General-Toshevo: Dobrudzha Agricultural Institute, 2012. (in Bulgarian)
- Ivanova V. New common winter wheat lines with resistance to leaf rust (*P. triticina*). In: VI International Agricultural Symposium "Agrosym 2015", 15–18 October, 2015. Jahorina (Bosnia and Herzegovina), 2015;169-175.
- Ivanova V. Monitoring on the pathogen population of *P. triticina* in Bulgaria during 2013–2014. *Int. J. Innov. Approaches Agric. Res.* 2020;4(3):353-365. DOI 10.29329/ijiaar.2020.274.8.
- Ivanova V., Chamurliiski P. Resistance of common winter wheat cultivars from different geographic origin to *P. triticina*. In: 52nd Croatian and 12th International Symposium on Agriculture, 12–17 February. Dubrovnik, 2017;216-221.
- Ivanova V., Mihova G., Ivanova B. New common winter wheat lines with resistance to leaf rust (*P. triticina*). *Int. J. Innov. Approaches Agric. Res.* 2019a;3(3):420-428. DOI 10.29329/ijiaar.2019.206.8.
- Ivanova V., Mihova G., Nikolova D., Velikova S. Screening of wheat genotypes for resistance to brown rust (*P. triticina*). *Field Crop Studies.* 2019b;XII(2):67-82. (in Bulgarian)
- Ivanova V., Velikova S., Nikolova D. Physiologic specialization of *Puccinia triticina* Erikss. and effectiveness of *Lr* genes in Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2021;27(3):555-561.
- Kadkhodaei M., Dadkhodaie A., Assad M.T., Heidari B., Mostowfizadeh-Chalamfarsa R. Identification of the leaf rust resistance genes *Lr9*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr34* and *Lr35* in a collection of Iranian wheat genotypes using STS and SCAR markers. *J. Crop Sci. Biotech.* 2012; 15(4):267-274. DOI 10.1007/s12892-012-0035-9.
- Knott D.R. *The Wheat Rusts – Breeding for Resistance*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. DOI 10.1007/978-3-642-83641-1.
- Kokhmetova A., Rsaliyev S., Atishova M., Kumarbayeva M., Malyshva A., Keishilov Zh., Zhanuzak D., Bolatbekova A. Evaluation of wheat germplasm for resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) and identification of the sources of *Lr* resistance genes using molecular markers. *Plants.* 2021;10(7):1484. DOI 10.3390/plants.10071484.
- Kolmer J.A. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1996;34:435-455. DOI 10.1146/annurev.phyto.34.1.435.
- Kolmer J.A. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests.* 2013;4(1):70-84. DOI 10.3390/f4010070.
- Li Z., Lan C., He Z., Singh R.P., Rosewarne G.M., Chen X., Xia X. Overview and application of QTL for adult plant resistance to leaf rust and powdery mildew in wheat. *Crop Sci.* 2014;54(5):1907-1925. DOI 10.2135/cropsci2014.02.0162.
- Limpert E., Müller K. Designation of pathotypes of plant pathogens. *J. Phytopathol.* 1994;140(4):346-358. DOI 10.1111/j.1439-0434.1994.tb00617.x.
- Lowe I., Cantu D., Dubcovsky J. Durable resistance to the wheat rusts: integrating systems biology and traditional phenotype-based research methods to guide the deployment of resistance genes. *Euphytica.* 2011;179(1):69-79. DOI 10.1007/s10681-010-0311-z.
- Modawi R.S., Browder L.L., Heyne E.G. Use of infection type data to identify genes for low reaction to *Puccinia recondita* in several winter wheat cultivars. *Crop Sci.* 1985;25(1):9-13. DOI 10.2135/cropsci1985.0011183X002500010003x.
- Morgunov A., Ablova I., Babayants O., Babayants L., Bepalova L., Khudokormov Zh., Litvinenko N., Shamanin V., Synkov V. Genetic protection of wheat from rusts and development of resistant varieties in Russia and Ukraine. In: *BGRI-2010 Technical Workshop*, 30–31 May 2010, St. Petersburg, Russia. New York, 2010; 1-20.
- Oelke L.M., Kolmer J.A. Characterization of leaf rust resistance in hard red spring wheat cultivars. *Plant Dis.* 2004;88(10):1127-1133. DOI 10.1094/PDIS.2004.88.10.1127.
- Park R.F., McIntosh R.A. Adult plant resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *N.Z.J. Crop Hortic. Sci.* 1994;22(2):151-158. DOI 10.1080/01140671.1994.9513819.
- Parlevliet J.E. Resistance of the non-race-specific type. In: Bushnell W.R., Roelfs A.P. (Eds.) *The Cereal Rusts*. Vol. II. Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control. Orlando, Florida: Acad. Press, 1985;501-525. DOI 10.1016/B978-0-12-148402-6.50024-9.
- Parlevliet J.E., Zadoks J.C. The integrated concept of diseases resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica.* 1977;26:5-21. DOI 10.1007/BF00032062.
- Pathan A., Park R. Evaluation of seedling and adult plant resistance to leaf rust in European wheat cultivars. *Euphytica.* 2006;149:327-342. DOI 10.1007/S10681-005-9081-4.
- Person C. Gene for gene relationships in host: parasite systems. *Can. J. Bot.* 1959;37(5):1101-1130. DOI 10.1139/b59-087.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 1948;26c(5):496-500. DOI 10.1139/cjr48c-033.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. *Rust Diseases of Wheat, Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico: CIMMYT, 1992.
- Singh R.P. Resistance to leaf rust in 26 Mexican wheat cultivars. *Crop Sci.* 1993;33(3):633-637. DOI 10.2135/cropsci1993.0011183X003300030041x.
- Singh R.P., Gupta A.K. Genes for leaf rust in Indian and Pakistani wheats tested with Mexican pathotypes of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Euphytica.* 1991;57:27-36. DOI 10.1007/BF00040475.
- Singh R.P., Rajaram S. Genetics of adult plant resistance to leaf rust in "Frontana" and three CIMMYT wheats. *Genome.* 1992;35(1):24-31. DOI 10.1139/g92-004.
- Singh R.P., Chen W.Q., He Z.H. Leaf rust resistance of spring facultative and winter wheat cultivars from China. *Plant Dis.* 1999;83(7): 644-651. DOI 10.1094/PDIS.1999.83.7.644.
- Singh R.P., Huerta E.J., Bhavani S., Herrera F.S.A., Singh D., Singh P.K., Velu G., Mason R.E., Jin Y., Njau P., Crossa J. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica.* 2011;179:175-186. DOI 10.1007/s10681-010-0322-9.

- Singh R.P., Singh P.K., Rutkoski J., Hodson D.P., He X., Jorgensen L.N., Hovmoller M.S., Huerta-Espino J. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016;54:303-322. DOI 10.1146/annurev-phyto-080615-095835.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of Physiologic Races of *P. graminis* var. *tritici*. Washington: US Department of Agriculture, USA, 1962.
- Statler G.D. Probable genes for leaf rust resistance in several hard red spring wheats. *Crop Sci.* 1984;24(5):883-886. DOI 10.2135/cropsci.1984.0011183X002400050013x.
- Stubbs R.W., Prescott J.M., Saari E.E., Dubin H.J. Cereal Disease Methodology Manual. Mexico: CIMMYT Publications, 1986.
- Van der Plank J.E. Plant Diseases: Epidemics and Control. Acad. Press, 1963. DOI 10.1016/C2013-0-11642-X.
- Volkova G.V., Kudinova O.A., Vaganova O.F. Selection of *Puccinia triticina* virulence genes on winter wheat varieties with different types of resistance. *Agrarian Bull. Urals.* 2020;199(8):25-33. DOI 10.32417/1997-4868-2020-199-8-25-33. (in Russian)
- Wu H., Kang Z.H., Li X., Li Y.Y., Li Y., Wang S., Liu D.Q. Identification of wheat leaf rust resistance genes in Chinese wheat cultivars and the improved germplasms. *Plant Dis.* 2020;104(10):2669-2680. DOI 10.1094/PDIS-12-19-2619-RE.
- Yan X.C., Li Z.F., Yang H.L., Zhang H.H., Gebrewahid T.W., Yao Z.J., Liu D.Q., Zhou Y. Analysis of wheat leaf rust resistance genes in 30 important wheat cultivars. *Sci. Agric. Sin.* 2017;50(2):272-285. DOI 10.3864/j.issn.0578-1752.2017.02.007.
- Zhang P.P., Gebrewahid T.W., Zhou Y., Li O.L., Li Z.F., Liu D.Q. Seedling and adult plant resistance to leaf rust in 46 Chinese bread wheat landraces and 39 wheat lines with known *Lr* genes. *J. Integr. Agric.* 2019;18(5):1014-1023. DOI 10.1016/S2095-3119(19)62575-X.

ORCID ID

V. Ivanova orcid.org/0000-0003-3745-5001

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Received October 27, 2022. Revised January 15, 2023. Accepted January 16, 2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Комплексная агробиологическая оценка и анализ генетических взаимосвязей перспективных сортов ореха грецкого Никитского ботанического сада

Ю.В. Плугатарь¹, И.И. Супрун²✉, С.Ю. Хохлов¹, И.В. Степанов², Е.А. Аль-Накиб²

¹ Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр Российской академии наук, Ялта, Республика Крым, Россия

² Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

✉ supruni@mail.ru

Аннотация. Орех грецкий – важная садовая культура, которая по объему производства занимает второе место среди всех орехоплодных. Несмотря на значительную потребность на внутреннем рынке, промышленное производство плодов ореха грецкого в России в настоящее время развито недостаточно. При этом существует необходимость обновления сортимента новыми высокопродуктивными сортами, адаптированными к местным агроклиматическим условиям и обладающими высоким качеством плодов, конкурентоспособными на мировом уровне. Важным вопросом для успешной реализации селекционных программ является комплексное изучение генофонда. В связи с этим в рамках исследования была поставлена задача оценки по комплексу признаков перспективных сортов из коллекции генофонда ореха грецкого Никитского ботанического сада и анализа генетических взаимосвязей на основе микросателлитного генотипирования. По результатам выполненной фенотипической оценки изучаемая выборка, включающая 31 сорт, была разделена на несколько групп по основным хозяйственно-биологическим характеристикам, таким как морозо- и засухоустойчивость, срок начала вегетации, сроки созревания, тип цветения, масса плода, толщина эндокарпа. Выделены сорта с хозяйственно ценными признаками, которые можно рекомендовать как перспективные в качестве исходных родительских форм в селекционной работе на устойчивость к абиотическим стресс-факторам, а также сорта с повышенной урожайностью и обладающие крупным размером плодов. На основании анализа восьми SSR-маркеров (WGA001, WGA376, WGA069, WGA276, WGA009, WGA202, WGA089 и WGA054) оценен уровень генетического разнообразия и определены генетические взаимосвязи в изученной выборке сортов. Выявлено наличие от шести (WGA089) до одиннадцати (WGA276) аллелей на локус. Суммарно по восьми использованным ДНК-маркерам было идентифицировано 70 аллелей при среднем значении 8.75. Анализ данных SSR-генотипирования в программе Structure 2.3.4 установил наличие двух основных групп генотипов. С учетом того, что все изученные сорта представляют собой отборы из местных семенных популяций в разных районах Крымского полуострова, выявленный уровень полиморфизма может опосредованно отражать уровень генетического разнообразия местного генофонда ореха грецкого. При этом наличие двух генетически обособленных групп, вероятно, свидетельствует о существовании двух независимо сформировавшихся пулов автохтонного генофонда вида *Juglans regia* L. на Крымском полуострове.

Ключевые слова: орех грецкий; SSR-маркеры; перспективные сорта; коллекция; генетическое разнообразие; фенотипическая оценка.

Для цитирования: Плугатарь Ю.В., Супрун И.И., Хохлов С.Ю., Степанов И.В., Аль-Накиб Е.А. Комплексная агробиологическая оценка и анализ генетических взаимосвязей перспективных сортов ореха грецкого Никитского ботанического сада. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):454-462. DOI 10.18699/VJGB-23-55

Comprehensive agrobiological assessment and analysis of genetic relationships of promising walnut varieties of the Nikitsky Botanical Gardens

Yu.V. Plugatar¹, I.I. Suprun²✉, S.Yu. Khokhlov¹, I.V. Stepanov², E.A. Al-Nakib²

¹ The Order of the Red Banner of Labour Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Yalta, Republic of Crimea, Russia

² North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, the Functional Scientific Center of "Breeding and Nursery", Krasnodar, Russia

✉ supruni@mail.ru

Abstract. Walnut is an important horticultural crop, the production of which ranks second among all nut crops. Despite the significant demand in the domestic market in Russia, the industrial production of walnut fruits in Russia is currently underdeveloped. At the same time, there is a need to update the assortment with new highly productive

varieties adapted to local agro-climatic conditions and having high quality nuts that are competitive at the world level. An important issue for the successful implementation of breeding programs is a comprehensive study of the gene pool. In this regard, within the framework of the study, the task was to evaluate promising varieties from the collection of the walnut gene pool of the Nikitsky Botanical Gardens and analyze genetic relationships based on microsatellite genotyping. On the basis of the performed phenotypic assessment, the study sample, which included 31 varieties, was divided into several groups according to the main phenotypic traits, such as frost and drought resistance, the start of the growing season, the ripening period, the weight and type of flowering, the weight of the fruit, and the thickness of the endocarp. Varieties with economically valuable traits that can be recommended as promising as initial parental forms in breeding work for resistance to abiotic stress factors have been identified, as well as varieties with increased productivity and large fruit sizes. Based on the analysis of eight SSR markers (WGA001, WGA376, WGA069, WGA276, WGA009, WGA202, WGA089 and WGA054), an analysis of the level of genetic diversity was performed and genetic relationships were established in the studied sample of varieties. Six (for WGA089) to eleven (for WGA276) alleles per locus have been identified. A total of 70 alleles were identified for the eight DNA markers used, with an average value of 8.75. Analysis of SSR genotyping data using Bayesian analysis established the presence of two main groups of genotypes. Taking into account the fact that all the studied varieties are selections from local seed populations in different regions of the Crimean Peninsula, the revealed level of polymorphism may indirectly reflect the level of genetic diversity of the local walnut populations. Furthermore, the presence of two genetically distant groups indicates the presence of two independently formed pools of the autochthonous gene pool of the species *Juglans regia* L. on the Crimean Peninsula.

Key words: walnut; SSR markers; perspective cultivars; collection; genetic diversity; phenotypic evaluation.

For citation: Plugatar Yu.V., Suprun I.I., Khokhlov S.Yu., Stepanov I.V., Al-Nakib E.A. Comprehensive agrobiological assessment and analysis of genetic relationships of promising walnut varieties of the Nikitsky Botanical Gardens. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):454-462. DOI 10.18699/VJGB-23-55

Введение

Орех грецкий – одна из важнейших орехоплодных культур, которая по объему производства уступает только миндалю. Мировые лидеры по производству ореха грецкого – Китай, Иран, США и Турция (Vahdati et al., 2019). Товарное производство плодов ореха грецкого в России в настоящее время не развито, однако имеются положительные тенденции по закладке промышленных садов. При этом существует необходимость обновления сортимента новыми высокопродуктивными сортами, адаптированными к местным агроклиматическим условиям и обладающими высоким качеством плодов.

Очевидно, что комплексное изучение генофонда ореха грецкого важно для повышения эффективности использования генетических ресурсов в решении селекционных задач по созданию сортов нового поколения, а также для сохранения и пополнения коллекций. При этом оценка уровня генетического разнообразия, выяснение степени генетического сходства, а также ДНК-паспортизация образцов коллекций занимают важное место. Одним из наиболее востребованных методов оценки генетического разнообразия ореха грецкого является анализ микросателлитных локусов генома (Vahdati et al., 2019). SSR-маркеры, широко применяемые в настоящее время для анализа полиморфизма ореха грецкого, разрабатывались как непосредственно для этого вида (Dangl et al., 2005; Torcu et al., 2015; Ikhsana et al., 2016), так и для вида *Juglans nigra* L. (Woeste et al., 2002). В дальнейшем эти маркеры были эффективны для изучения межвидового разнообразия *J. regia* благодаря высокому уровню кросс-воспроизводимости в пределах рода *Juglans*. Стоит выделить SSR-маркеры, маркируемые как WGA, которые применяются особенно часто (Bernard et al., 2018b). С помощью SSR-маркеров для грецкого ореха выполнен значительный объем работ, направленных на анализ генетической структуры коллекций генофонда, включая сорта, перспек-

тивные селекционные формы, а также отборы из местных популяций, представляющие интерес для селекции.

К наиболее масштабным исследованиям генетического разнообразия коллекций генетических ресурсов можно отнести работу, выполненную коллективом авторов из научного центра INRA, в которой с использованием 13 SSR-маркеров осуществили генотипирование 217 образцов ореха грецкого и 36 образцов других видов рода *Juglans* из коллекции INRA. По данным SSR-генотипирования было установлено наличие двух основных групп наибольшего генетического сходства, которые по большей части соответствовали эколого-географическому происхождению сортов. Полученные данные позволили сформировать базовую коллекцию (core-collection) из пятидесяти образцов, отображающую генетический полиморфизм всей выборки (Bernard et al., 2018a). Примечательно, что сравнительный анализ эффективности 13 SSR-маркеров в вышеупомянутой работе (Bernard et al., 2018a) и 364275 SNP-маркеров – данных, полученных с применением SNP-чипа “Axiom™ *J. regia* 700K SNP genotyping array”, показал близкий уровень информативности двух типов ДНК-маркеров при оценке генетической структуры коллекций (Bernard et al., 2018a, 2020a). Сопоставимое по масштабу исследование выборки из 189 сортов и селекционных форм, репрезентативно представляющей генколлекции из 25 регионов в 14 странах мира, позволило установить наличие двух главных групп, включивших образцы из Европы и Северной Африки и из Греции и Ближнего Востока (Ebrahimi et al., 2016). Наряду с упомянутыми масштабными исследованиями, выполнен широкий перечень работ с применением микросателлитов на коллекциях генофонда, а также местных популяциях в разных регионах мира: Европе (Pollegioni et al., 2011; Ebrahimi et al., 2017b; Vischi et al., 2017; Cseke et al., 2022), Восточной Азии (Gunn et al., 2010; Wang et al., 2015; Zhou et al., 2021), Средней и Южной Азии (Pollegioni et al., 2014; Roor et al., 2017; Shah

et al., 2018; Gaisberger et al., 2020; Magige et al., 2022), Ближневосточном регионе (Ebrahimi et al., 2011; Shamlu et al., 2018; Orhan et al., 2020; Davoodi et al., 2021; Guney et al., 2021), Северной Америке (Dangl et al., 2005; Aradhya et al., 2010; Ebrahimi et al., 2017a).

В дополнение к молекулярно-генетическому анализу полиморфизма на основе SSR-маркеров, нередко выполняется также комплексная оценка фенотипической изменчивости выборок образцов (Ebrahimi et al., 2011) или оценка по отдельным группам признаков, к примеру по характеристикам плодов (Chen et al., 2014). Это позволяет как сравнивать эффективность применения разных подходов для определения групп наибольшего генетического сходства (Pop et al., 2013), так и выделять селекционно ценные образцы на первом этапе и в дальнейшем оценивать гетерогенность отобранных групп образцов на основе данных микросателлитного анализа (Karimi et al., 2014; Davoodi et al., 2021).

Несмотря на проводимую селекционную работу по грецкому ореху на юге России (Луговской, Мурзинова, 2010; Хохлов, Баскакова, 2015; Супрун и др., 2016; Луговской, Балапанов, 2018) и наличие результатов изучения коллекций сортов с применением молекулярно-генетических методов (Balapanov et al., 2019), все же отметим ограниченность исследований, направленных на анализ уровня генетического разнообразия и выявление генетической структуры генофонда на Юге России, включая Крым и Северный Кавказ. Никитский ботанический сад (НБС-ННЦ) является одной из ведущих научных организаций в Российской Федерации, выполняющих селекционную работу по ореху грецкому. Коллекция генетических ресурсов ореха грецкого Никитского ботанического сада представлена 76 образцами. Основу составляют сорта селекции НБС-ННЦ (86 %). Среди интродуцированных генотипов 10 % от общего объема коллекции приходится на сорта из Молдавии и по 3 % – на образцы из Украины, Европы, США и Таджикистана (Хохлов, Баскакова, 2015). Очевидно, что комплексная фенотипическая оценка, выделение групп наиболее ценных генотипов, характеризующихся наличием одновременно нескольких селекционно ценных признаков, а также анализ генетических взаимосвязей ценных сортов и форм позволят повысить эффективность селекционного использования генофонда в целях создания новых адаптивных сортов с повышенным потенциалом продуктивности и высоким качеством плодов.

В представленной работе нами была поставлена задача провести оценку перспективных сортов ореха грецкого из коллекции генофонда НБС-ННЦ по хозяйственно ценным признакам, выделить группы сортов, обладающие комплексом важных характеристик, и выполнить анализ их генетических взаимосвязей с использованием микросателлитных ДНК-маркеров.

Материалы и методы

Фенотипическую оценку проводили в коллекционных насаждениях лаборатории степного садоводства (ЛСС) НБС-ННЦ в 2014–2022 гг. В качестве объекта наблюдений был выбран 31 образец ореха грецкого селекции Никитского ботанического сада (Хохлов, 2012). Территория ЛСС расположена в 25 км к северу от г. Симферополя, в селе

Новый Сад (45°08'50" N, 33°59'55" E), Республика Крым, Россия. В системе агроклиматического районирования полуострова она относится к центральному равнинно-степному району, характеризующемуся засушливым климатом с умеренно жарким вегетационным периодом и мягкой, неустойчивой зимой (Антюфеев и др., 2002). Также в работе по генотипированию был использован сорт Чандлер селекции США. Рельеф местности, на которой находится коллекционный сад, равнинный слабоволнистый; почва участка – чернозем южный карбонатный малогумусный тяжелосуглинистый на красно-бурых плиоценовых глинах. Средняя годовая температура воздуха составляет +10.5 °С, средняя температура января не превышает –1.0 °С, а июля – +21.9 °С. Растения ореха посажены по схеме 12×12 м, в качестве уплотнителя используется персик. Междурядья содержатся под черным паром. Возраст деревьев 30 лет.

Степень морозостойкости сортов определяли по методике, разработанной в Никитском саду (Рихтер, Ядров, 1985), и по методу Лапина и Рябовой (1982). Засухоустойчивость растений ореха оценивали в соответствии с методическими рекомендациями (Еремеев, Лищук, 1974; Кушниренко и др., 1975; Ильницкий, 2005).

Для экстракции ДНК применяли модифицированный СТАВ-метод (Rogers, Bendich, 1985). Генотипирование сортов ореха грецкого проводилось с использованием восьми SSR-маркеров: WGA001, WGA376, WGA069, WGA276, WGA009, WGA202, WGA089, WGA054 (Woeste et al., 2002; Dangl et al., 2005). ПЦР проходила при следующих условиях: концентрация реактивов ПЦР смеси: буфер 1X, dNTP – 0.24 mM, Taq 1U, SSR-праймеры (прямой и обратный) – по 0.16 мкМ каждого, ДНК – 40–50 нг. Параметры ПЦР: 3 мин начальная денатурация при 94 °С; затем 35 циклов: 20 с денатурация при 94 °С, 30 с отжиг праймеров при 58 °С, 40 с элонгация при 72 °С; заключительная элонгация 10 мин при 72 °С. Анализ размеров продуктов реакции проводили на автоматическом генетическом анализаторе Нанофор 05.

Обработку данных осуществляли в программе Gene Marker V3.0.1. В макросе Microsoft Excel GenAlEx 6.503 рассчитывались следующие генетические параметры: Na – число аллелей, Na (ср.) – среднее число аллелей, Ne – эффективное число аллелей, I – индекс разнообразия Шеннона, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации (Peakall, Smouse, 2012). График PCoA с коэффициентом генетического сходства Dice построен в программе Past 2.17 (Hammer et al., 2001) на основе бинарной матрицы. Кластерный анализ выполнен в программе Structure 2.3.4. Оптимальное значение кластеров для проведения анализа было установлено в онлайн-программе Structure Harvester (Evanno et al., 2005).

Результаты исследований

Фенотипическая оценка

На основании выполненной комплексной фенотипической оценки изучаемые сорта по основным хозяйственно-биологическим характеристикам были объединены в несколько групп.

По степени морозоустойчивости: *высокоморозостойкие* сорта, у которых без повреждений сохранялось 60–100 % генеративных и вегетативных почек – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Скабери’, ‘Южнобережный’, ‘Поздноцветущий’; *среднеморозостойкие* (от 40 до 60 %) – ‘Боспор’, ‘Альминский’, ‘Конкурсный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Долинный’, ‘Золотополянский’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Жемчужный’, ‘Соколиный’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Партизанский’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Комсомолец’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Коллективный’; *низкоморозостойкие* (менее 40 %) – ‘Бубенчик’, ‘Кача’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’.

По степени засухоустойчивости: *с высокой устойчивостью* – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Жемчужный’; *с устойчивостью выше средней* – ‘Альминский’, ‘Боспор’, ‘Конкурсный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Золотополянский’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Южнобережный’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Коллективный’, ‘Партизанский’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Скабери’, ‘Бомба Чкаловская’; *с устойчивостью ниже средней* – ‘Бубенчик’, ‘Кача’.

По сроку созревания: *ранний* – ‘Аркад’, ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Комсомолец’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Жемчужный’, ‘Орионид’, ‘Южнобережный’; *средний* – ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Золотополянский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Дзержинский’, ‘Боспор’, ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Подлесный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’, ‘Коллективный’; *поздний* – ‘Конкурсный’, ‘Малосадовый’.

По типу цветения: *протогения* (сначала зацветают мужские соцветия) – ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’; *протандрия* (сначала распускаются женские цветки) – ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Конкурсный’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’; *гомогамия* (одновременное цветение мужских соцветий и женских цветков) – ‘Золотополянский’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Жемчужный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Южнобережный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’.

По массе плода: *крупноплодные* (более 12 г, относятся к разновидности *J. regia* L. var. *macrocarpa* DC. или *J. regia* f. *taxima*) – ‘Бомба Чкаловская’, ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Скабери’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’; *среднеплодные* (от 6 до 12 г) – ‘Альминский’, ‘Золотополянский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Южнобережный’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Новиков’, ‘Партизанский’, ‘Конкурсный’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’,

‘Жемчужный’; *мелкоплодные* (менее 6 г) – ‘Бубенчик’. У всех сортов, за исключением ‘Бомба Чкаловская’, форма плода овально-округлая или яйцевидная.

По толщине эндокарпа: *тонкоскорлупые* (от 1 до 1.5 мм, относятся к разновидности *J. regia* L. var. *tenera* DC.) – ‘Золотополянский’, ‘Южнобережный’; *стандартноскорлупые* (от 1.5 до 2 мм, *J. regia* f. *semidura* DC.) – ‘Бомба Чкаловская’, ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Скабери’, ‘Партизанский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’, ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Жемчужный’; *твердоскорлупые* (более 2 мм, относятся к разновидности *J. regia* L. var. *dura* DC.) – ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Конкурсный’, ‘Дзержинский’.

По сроку начала вегетации: *ранний* – ‘Долинный’, ‘Комсомолец’, ‘Аркад’, ‘Жемчужный’, ‘Бельбекский Ранний’; *средний* – ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Булганак’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’, ‘Бубенчик’, ‘Коллективный’, ‘Кача’, ‘Партизанский’, ‘Дзержинский’, ‘Бельбекский’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Золотополянский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Бурлюк’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’, ‘Южнобережный’, ‘Крымский Скороплодный’; *поздний* – ‘Поздноцветущий’, ‘Конкурсный’.

Результаты многолетнего изучения генофонда ореха грецкого позволяют выделить сорта с хозяйственно ценными признаками, которые можно рекомендовать в качестве исходных родительских форм в селекционной работе: на устойчивость к неблагоприятным зимне-весенним условиям – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Скабери’, ‘Южнобережный’, ‘Поздноцветущий’; на повышенную и высокую засухоустойчивость – ‘Аркад’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Жемчужный’. Для внедрения в производство рекомендуются сорта с комплексной устойчивостью к неблагоприятным климатическим условиям – ‘Бурлюк’, ‘Боспор’, ‘Аркад’, ‘Альминский’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Орионид’, ‘Конкурсный’, а также характеризующиеся высокой урожайностью и крупноплодностью – ‘Булганак’, ‘Долинный’, ‘Пионер Крыма’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Скабери’, ‘Партизанский’, ‘Комсомолец’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’, ‘Аркад’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Бурлюк’, ‘Поздноцветущий’, ‘Соколиный’, ‘Боспор’, ‘Орионид’.

Анализ генетического разнообразия

В целях установления генетических взаимосвязей внутри изученной выборки сортов, анализа уровня генетического разнообразия и определения групп наибольшего генетического родства был выполнен анализ полиморфизма микросателлитных локусов.

В результате получены ДНК-профили, специфичные для всех изученных сортов. Выявлено от шести (WGA089) до одиннадцати (WGA276) аллелей на локус. Суммарно по восьми использованным ДНК-маркерам было идентифицировано 70 аллелей при среднем значении 8.75. Анализ уровня генетического полиморфизма включал показатели, представленные в табл. 1.

Таблица 1. Уровень полиморфизма SSR-маркеров

Локус	Na	Ne	I	Ho	He
WGA001	9.000	4.854	1.781	0.710	0.794
WGA376	9.000	5.071	1.829	0.677	0.803
WGA069	10.000	6.160	2.022	0.677	0.838
WGA276	11.000	6.450	2.060	0.645	0.845
WGA009	9.000	4.215	1.750	0.419	0.763
WGA202	9.000	3.269	1.487	0.484	0.694
WGA089	6.000	2.873	1.337	0.484	0.652
WGA054	7.000	4.107	1.579	0.581	0.757
Среднее	8.750	4.625	1.731	0.585	0.768

Примечание. Na – число выявленных аллелей; Ne – число эффективных аллелей; I – индекс разнообразия; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность.

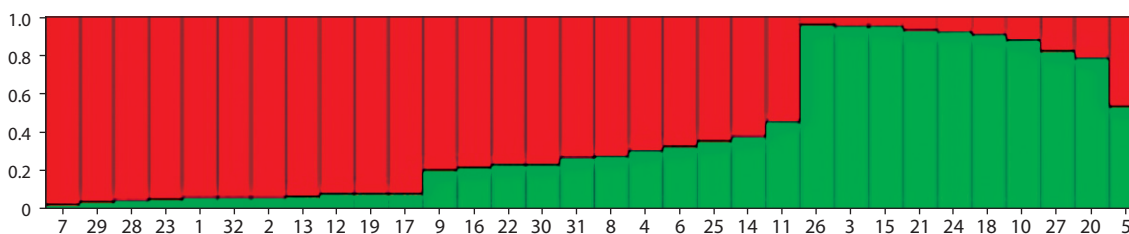


Рис. 1. График, построенный в программе Structure по данным генотипирования восемью SSR-маркерами 32 сортов ореха грецкого.

Названия сортов: 1 – ‘Альминский’, 2 – ‘Новиков’, 3 – ‘Булганак’, 4 – ‘Бубенчик’, 5 – ‘Аркад’, 6 – ‘Гурзуфский’, 7 – ‘Сладкоядерный’, 8 – ‘Золотополянский’, 9 – ‘Крымский Скороплодный’, 10 – ‘Долинный’, 11 – ‘Коллективный’, 12 – ‘Жемчужный’, 13 – ‘Конкурсный’, 14 – ‘Кача’, 15 – ‘Партизанский’, 16 – ‘Памяти Пасенкова’, 17 – ‘Поздноцветущий’, 18 – ‘Пионер Крыма’, 19 – ‘Держинский’, 20 – ‘Соколиный’, 21 – ‘Бельбекский’, 22 – ‘Боспор’, 23 – ‘Комсомолец’, 24 – ‘Бельбекский Ранний’, 25 – ‘Бомба Чкаловская’, 26 – ‘Малосадовый’, 27 – ‘Подлесный’, 28 – ‘Скабери’, 29 – ‘Южнобережный’, 30 – ‘Бурлюк’, 31 – ‘Орионид’, 32 – ‘Чандлер’.

Значение показателя Ne варьировало от 2.873 (WGA089) до 6.450 (WGA276). При этом в группе маркеров с одинаковым числом аллелей (9 аллелей на локус), WGA001, WGA376, WGA009 и WGA202, данный показатель варьировал от 3.269 (WGA202) до 5.071 (WGA376), что может быть обусловлено изменением частот встречаемости аллелей. Наименьшее (1.337) и наибольшее (2.060) значение индекса разнообразия I было определено у наименее полиморфного маркера WGA089 и наиболее полиморфного маркера WGA276 соответственно. При этом максимальное значение величины наблюдаемой гетерозиготности было выявлено по маркеру WGA001, а ожидаемой гетерозиготности – по маркеру WGA276.

На основе данных генотипирования 32 сортов ореха грецкого по восьми SSR-маркерам был проведен анализ в программе Structure 2.3.4. Количество проанализированных кластеров было в пределах от 2 до 7. Исходя из результатов анализа в онлайн-программе Structure Harvester рассчитано оптимальное значение кластеров, равное 2. Результаты, полученные при значении K = 2, представлены на рис. 1.

По преобладанию первого или второго кластеров изученные крымские сорта можно условно разделить на две группы. Первая группа (доминирует кластер 1): ‘Бул-

ганак’, ‘Аркад’, ‘Долинный’, ‘Партизанский’, ‘Пионер Крыма’, ‘Соколиный’, ‘Бельбекский’, ‘Бельбекский Ранний’, ‘Малосадовый’, ‘Подлесный’. Вторая группа (преобладает кластер 2): ‘Альминский’, ‘Новиков’, ‘Бубенчик’, ‘Гурзуфский’, ‘Сладкоядерный’, ‘Золотополянский’, ‘Крымский Скороплодный’, ‘Коллективный’, ‘Жемчужный’, ‘Конкурсный’, ‘Кача’, ‘Памяти Пасенкова’, ‘Поздноцветущий’, ‘Держинский’, ‘Боспор’, ‘Комсомолец’, ‘Бомба Чкаловская’, ‘Скабери’, ‘Южнобережный’, ‘Бурлюк’, ‘Орионид’. Сорт ‘Чандлер’ был отнесен ко второй группе сортов. Стоит отметить, что часть сортов из второй группы обладает значительным вкладом первого кластера (от 0.185 до 0.481), в то же время у двух сортов из первой группы выявлен существенный вклад второго кластера (0.215 и 0.448).

Для детальной оценки генетического родства исследуемых генотипов ореха грецкого был осуществлен анализ методом главных координат (PCoA) в программе PAST 2.17 (рис. 2).

Распределение сортов на графике PCoA в значительной степени отражает группировку сортов, полученную в программе Structure. Сорта первой группы сосредоточены в нижней части графика. В свою очередь сорта второй группы находятся в средней и верхней части графика.

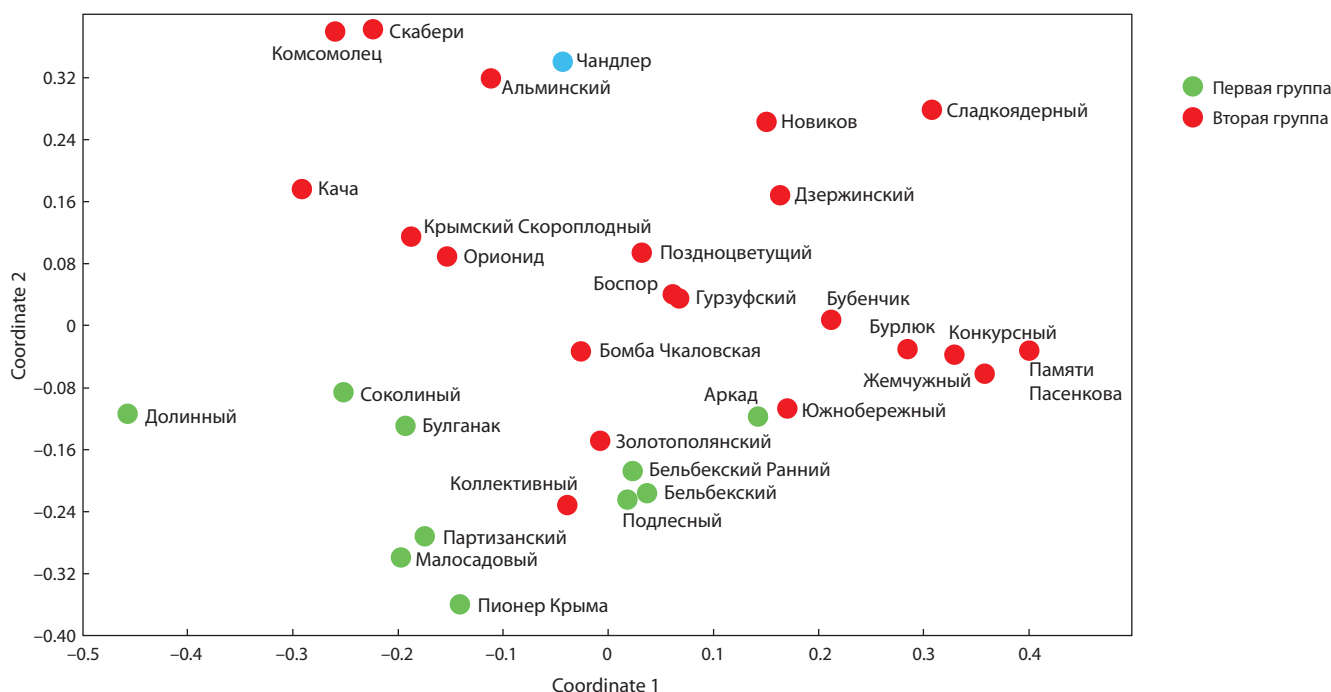


Рис. 2. Оценка генетического родства сортов ореха грецкого методом главных координат по данным SSR-генотипирования.

В расположении сортов первой группы можно выделить подгруппы: 1) сорта ‘Бельбекский Ранний’, ‘Бельбекский’ и ‘Подлесный’; 2) ‘Партизанский’, ‘Малосадовый’, ‘Пионер Крыма’; 3) ‘Соколиный’, ‘Булганак’. Два сорта из первой группы не были отнесены ни к одной из подгрупп: ‘Аркад’ занимает промежуточное положение между сортами первой и второй группы, сорт ‘Долинный’ равноудален от других сортов, включенных в первую группу.

Сорта второй группы распределены на графике менее упорядоченно и не формируют четких структур, однако надо отметить, что ‘Коллективный’, ‘Золотополянский’, ‘Бомба Чкаловская’ и ‘Южнобережный’ занимают промежуточное положение между сортами первой и второй групп. Сорт ‘Чандлер’ на графике главных координат пространственно близок сорту ‘Альминский’.

Обсуждение

Использованные нами SSR-маркеры ранее широко применялись для решения различных задач в генетике и селекции ореха грецкого, включая ДНК-паспортизацию и анализ генетического разнообразия коллекций сортов, селекционно-перспективных форм и межвидовых гибридов (Woeste et al., 2002; Pollegioni et al., 2009; Ebrahimi et al., 2016; Vahdati et al., 2019), изучение признаков коллекций (Ebrahimi et al., 2017a), выяснение вопросов формирования генофонда в пределах ареалов его естественного произрастания, а также путей распространения в процессе доместикизации (Pollegioni et al., 2014, 2015, 2017).

Сравнение средних значений показателей, характеризующих полиморфизм, выявленный по результатам нашей работы и в исследованиях, проведенных на коллекциях сортов ореха грецкого из других регионов мира, позволяет сопоставить уровень генетической гетерогенности генофонда. Так, анализ коллекции из 35 сортов китайской

селекции с использованием десяти SSR-маркеров выявил средние значения N_a и N_e 9.4 и 4.67 соответственно, а значения ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности – 0.77 и 0.62 (Chen et al., 2014). М. Aradhya с коллегами (Aradhya et al., 2010) при анализе генетического полиморфизма коллекции, насчитывающей 236 сортов, из различных регионов ореховодства с применением 15 микросателлитных маркеров получили средний показатель количества выявленных аллелей на locus, равный 11; при этом средние значения показателей H_e и H_o составили 0.699 и 0.536 соответственно. Отметим, что в этой работе маркеры WGA001, WGA202, WGA009 и WGA069 показали более высокий полиморфизм (12, 19, 11 и 13 аллелей на locus соответственно), тогда как маркер WGA089 оказался одним из наименее полиморфных (8 аллелей) (Aradhya et al., 2010). Нами были получены сходные результаты по уровню аллельного полиморфизма маркеров (см. табл. 1).

Анализируя выборку из 189 сортов, представляющих генофонд 14 стран, А. Ebrahimi с коллегами выявили в среднем 11.5 аллеля на locus, при этом средние показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности были равны 0.62 и 0.73 (Ebrahimi et al., 2016). В данной работе маркеры WGA001, WGA202 и WGA276, так же как и в нашем исследовании, вошли в группу более полиморфных, а маркер WGA068 проявил более низкий уровень полиморфизма. Турецкие ученые, выполнившие генотипирование 30 элитных селекционных форм (кандидаты в сорта) с применением 21 SSR-маркера, идентифицировали в среднем 6.15 аллеля на locus; наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность составили 0.64 и 0.62 (Bozhuyuk et al., 2020).

Рассматривая работы, направленные на изучение генетического разнообразия природных популяций и пер-

Таблица 2. Сравнение групп сортов ореха грецкого по генетическим характеристикам

Группа	Na	Ne	I	Ho	He	F
Первая	4.125	2.581	1.082	0.588	0.579	-0.009
Вторая	8.375	5.063	1.783	0.583	0.786	0.258

спективных для селекции форм, из них отобранных, можно также говорить о сопоставимом уровне полиморфизма. К примеру, при выполнении оценки полиморфизма и генетических взаимосвязей в выборке из 39 образцов ореха грецкого, отобранных в природных популяциях на северо-востоке Ирана, среднее число аллелей на локус составило 7.9, а число эффективных аллелей – 3.91 (Shamlu et al., 2018). Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность были равны 0.74 и 0.93 соответственно. При этом индекс разнообразия был ниже выявленного нами показателя – 1.34 (Shamlu et al., 2018).

В исследованиях, посвященных анализу структуры природных популяций, выяснению путей распространения генофонда и формированию его локальных пулов, рассматриваемые показатели количества аллелей варьировали. Так, при изучении генетического разнообразия местных популяций в итальянских Восточных Альпах (Vischi et al., 2017) среднее число аллелей на локус составило 4.7 при выборке 13 маркеров (WGA класс) и 2.7 в выборке из семи EST-SSR-маркеров, что является низким показателем, особенно учитывая объем выборки – около 200 образцов. Возможно, это объясняется изолированностью изученной популяции, отобранной в гористой местности, а также на равнинном участке, который ею ограничен (Vischi et al., 2017). При анализе выборки из 86 генотипов, отобранных в пяти географических локациях природных популяций ореха грецкого на Юго-Западе Тибета, показатель Na был равен 9.92, однако значение Ne составило 3.95, что может быть результатом неравномерного распределения частот встречаемости аллелей (Wang et al., 2015). В исследовании, направленном на изучение путей формирования и распространения генофонда ореха грецкого от центров его происхождения на территории Евразии, в результате SSR-генотипирования выборки объемом около 2000 генотипов с использованием 14 SSR-маркеров выявлено в среднем 14.21 аллеля на локус (Pollegioni et al., 2017).

В целом, рассматривая работы, посвященные генетическому полиморфизму генофонда ореха грецкого как культурных форм (сорта, гибриды, селекционные отборы из местных популяций), так и местных популяций, включая природные в регионах, относящихся к центрам происхождения вида *J. regia* L., можно сделать вывод о высоком уровне полиморфизма изученной нами выборки сортов. Учитывая тот факт, что все рассмотренные сорта являются отборами из местных семенных популяций в разных районах Крымского полуострова, данный уровень полиморфизма может опосредованно отражать уровень генетического разнообразия местного генофонда ореха грецкого. Это в определенной степени подтверждается результатами, полученными нами в ходе кластерного анализа. На основе наших данных можно сделать предва-

рительный вывод о том, что автохтонный генофонд ореха грецкого, возможно, происходит от двух гипотетических популяций. Разделение изучаемой выборки сортов на две группы по результатам байесовского анализа согласуется с высоким уровнем полиморфизма, так как наличие двух генетически обособленных групп может способствовать более высокому уровню генетической гетерогенности, включая аллельный полиморфизм ДНК-маркеров.

В работе были сопоставлены выявленные в ходе кластеризации группы по ряду популяционно-генетических параметров (табл. 2).

Значение среднего количества аллелей на локус во второй группе в два раза выше этого показателя в первой группе. Такие показатели генетического разнообразия, как эффективное число аллелей и индекс разнообразия Шеннона, тоже отражают больший аллельный полиморфизм микросателлитных маркеров во второй группе сортов. Наблюдаемая гетерозиготность в группах имеет сходное значение – 0.583 и 0.588, в свою очередь ожидаемая гетерозиготность выше во второй группе. Индекс фиксации имеет низкое положительное значение во второй группе, у сортов первой группы параметр стремится к нулевому значению.

На генетическом уровне различия между группами, кроме специфического аллельного состава SSR-локусов, характерного для каждой выборки сортов, выражены в степени аллельного разнообразия. Вторая группа сортов значительно превосходит первую по значению ряда генетических параметров, отражающих степень аллельного разнообразия. Можно предположить, что первая группа сортов представлена наиболее обособленной частью автохтонного генофонда Крымского полуострова. В свою очередь на генетическое разнообразие второй группы оказал влияние генетический вклад интродуцированной генплазмы, привнесенной в регион извне. Дополнительным подтверждением данного предположения является отнесение сорта ‘Чандлер’ селекции США ко второй группе. Значение индекса фиксации у первой группы сортов характерно для популяций, находящихся в состоянии панмиксии и отсутствия генетических барьеров, увеличивающих количество наблюдаемых гомозигот. Данные, полученные в программе Structure 2.3.4, свидетельствуют о генетической связи между группами, выраженной в наличии образцов с сопоставимым вкладом двух кластеров. Поскольку изученные сорта представляют собой формы, отобранные в популяции ореха грецкого, существующей в границах Крымского полуострова, можно предположить, что высокие значения наблюдаемой гетерозиготности отражают значительные размеры генофонда ореха грецкого, способствующие панмиксии. В целом для первой группы сортов ореха грецкого характерны высокая урожайность и крупные плоды (более 12 г).

Заключение

На основании комплексной фенотипической оценки образцов из коллекции генофонда ореха грецкого Никитского ботанического сада выделены группы сортов, обладающие комплексом хозяйственно ценных признаков. При выполнении микросателлитного генотипирования был установлен высокий уровень генетического разнообразия и наличие двух генетически отличных групп сортов. Одна из групп включает преимущественно крупноплодные сорта с повышенным потенциалом продуктивности, что актуализирует использование данных сортов в качестве селекционного материала. Их генетическая удаленность от остального генофонда может способствовать повышению эффекта гетерозиса при гибридизации.

Список литературы / References

- Антуфеев В.В., Вазов В.И., Рябов В.А. Справочник по климату Степного отделения Никитского ботанического сада. Ялта, 2002.
[Antufeev V.V., Vazhov V.I., Ryabov V.A. Reference Book on the Climate of the Steppe Department of the Nikitsky Botanical Garden. Yalta, 2022. (in Russian)]
- Еремеев Г.Н., Лищук А.И. Методические указания по отбору засухоустойчивых сортов и подвоев плодовых растений. Ялта, 1974.
[Eremeev G.N., Lishchuk A.I. Guidelines for Selecting Drought-resistant Cultivars and Stocks of Fruit Plants. Yalta, 1974. (in Russian)]
- Ильницкий О.А. Основы фитомониторинга (мониторинг физиологических процессов в растениях). Херсон, 2005.
[Il'nikskiy O.A. Fundamentals of Phytomonitoring (Monitoring of Physiological Processes in Plants). Kherson, 2015. (in Russian)]
- Кушниренко М.Д., Курчатова Г.П., Крюкова Е.В. Методы оценки засухоустойчивости плодовых растений. Кишинев, 1975.
[Kushnirenko M.D., Kurchatova G.P., Kryukova E.V. Methods for Assessing the Drought Resistance of Fruit Plants. Chisinau, 1975. (in Russian)]
- Лалин П.И., Рябова Н.В. Некоторые проблемы практики интродукции древесных растений в ботанических садах. В: Исследование древесных растений при интродукции. М.: Наука, 1982;5-29.
[Lapin N.I., Ryabova N.V. Some issues in the practice of woody plant introduction in botanical gardens. In: Study of Woody Plants During Introduction. Moscow: Nauka Publ., 1982;5-29. (in Russian)]
- Луговской А.П., Балапанов И.М. Перспективные сорта ореха грецкого для зоны Северного Кавказа и их биологическая характеристика. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2018; 51(3):98-110. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-98-110.
[Lugovskoy A.P., Balapanov I.M. Prospective persian walnut cultivars for North Caucasus zone and their biological characteristics. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of the South of Russia*. 2018;51(3):98-110. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-98-110. (in Russian)]
- Луговской А.П., Мурзинова Д.Г. Совершенствование системы возделывания ореха грецкого на Северном Кавказе. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2010;6(5):15-23.
[Lugovskoi A.P., Murzinova D.G. Improving the sistem of walnut groving in Northern Caucasus. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of the South of Russia*. 2010; 6(5):15-23. (in Russian)]
- Рихтер А.А., Ядров А.А. Грецкий орех. М., 1985.
[Rihter A.A., Yadrov A.A. Walnut. Moscow, 1985. (in Russian)]
- Супрун И.И., Луговской А.П., Балапанов И.М. Интродукция новых форм и пополнение генофонда ореха грецкого как основа улучшения сортимента культуры на Юге России. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2016;39(3):26-41.
[Suprun I.I., Lugovskoy A.P., Balapanov I.M. Introduction of new forms and updating the walnut gene pool as the basis of improvement of crop's assortment in the South of Russia. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of the South of Russia*. 2016;39(3):26-41. (in Russian)]
- Хохлов С.Ю. Сортовое разнообразие ореха грецкого в Крыму и перспективы его использования в селекции. *Бюл. Гос. Никитского ботан. сада*. 2012;105:57-61.
[Khokhlov S.Yu. Study of varietals diversity of walnuts in the Crimea and the perspective of its use in selection. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*. 2012;105:57-61. (in Russian)]
- Хохлов С.Ю., Баскакова В.Л. Коллекция ореха грецкого. *Науч. записки природного заповедника «Мыс Мартьян»*. 2015;6:235-238.
[Khokhlov S.Yu., Baskakova V.L. Collection of circassian walnut. *Nauchnye Zapiski Prirodnogo Zapovednika "Mys Mart'yan" = Proceedings of the Cape Martyan Nature Reserve*. 2015;6:235-238. (in Russian)]
- Aradhya M., Woeste K., Velasco D. Genetic diversity, structure and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Hortic*. 2010;861:127-132. DOI 10.17660/ActaHortic.2010.861.16.
- Balapanov I., Suprun I., Stepanov I., Tokmakov S., Lugovskoy A. Comparative analysis Crimean, Moldavian and Kuban Persian walnut collections genetic variability by SSR-markers. *Sci. Hortic*. 2019; 253:322-326. DOI 10.1016/j.scienta.2019.04.014.
- Bernard A., Barreneche T., Lheureux F., Dirlwanger E. Analysis of genetic diversity and structure in a worldwide walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using SSR markers. *PLoS One*. 2018a;13(11): 0208021. DOI 10.1371/journal.pone.0208021.
- Bernard A., Lheureux F., Dirlwanger E. Walnut: past and future of genetic improvement. *Tree Genet. Genomes*. 2018b;14:1. DOI 10.1007/s11295-017-1214-0.
- Bernard A., Barreneche T., Donkpegan A., Lheureux F., Dirlwanger E. Comparison of structure analyses and core collections for the management of walnut genetic resources. *Tree Genet. Genomes*. 2020a; 16:76. DOI 10.1007/s11295-020-01469-5.
- Bernard A., Marrano A., Donkpegan A., Brown P.J., Leslie C.A., Neale D.B., Lheureux F., Dirlwanger E. Association and linkage mapping to unravel genetic architecture of phenological traits and lateral bearing in Persian walnut (*Juglans regia* L.). *BMC Genomics*. 2020b;21(1):20. DOI 10.21203/rs.2.18573/v1.
- Bozhuyuk M.R., Ercisli S., Orhan E., Koc A. Determination of the genetic diversity of walnut (*Juglans regia* L.) cultivar candidates from northeastern Turkey using SSR markers. *Mitt. Klosterneubg*. 2020; 70(4):269-277.
- Chen L.N., Ma Q.G., Chen Y.K., Wang B.Q., Pei D. Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers. *Sci. Hortic*. 2014;168:240-248. DOI 10.1016/j.scienta.2014.02.004.
- Cseke K., Bujdosó G., Báder M., Mertl T., Benke A., Kámpel J.D. Genetic identification of hybrid walnuts (*Juglans × intermedia* Carr.) in Hungary, the hidden potential for future breeding. *Sustainability*. 2022;14(8):4782. DOI 10.3390/su14084782.
- Dangl G.S., Woeste K., Aradhya M.K., Koehmstedt A., Simon C., Potter D., Leslie C.A., McGranahan G. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivars identification of walnut. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 2005;130(3):348-354. DOI 10.21273/JASHS.130.3.348.
- Davoodi F., Rezaei M., Heidari P., Hokmabadi H., Lawson S. Identification and DNA fingerprinting of some superior Persian walnut genotypes in Iran. *Erwerbs-Obstbau*. 2021;63:393-402. DOI 10.1007/s10341-021-00597-z.
- Ebrahimi A., Fatahi R., Zamani Z. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. *Sci. Hortic*. 2011;130(1):146-151. DOI 10.1016/j.scienta.2011.06.028.
- Ebrahimi A., Zarei A., Lawson S., Woeste K.E., Smulders M.J.M. Genetic diversity and genetic structure of Persian walnut (*Juglans regia*) accessions from 14 European, African, and Asian countries using SSR markers. *Tree Genet. Genomes*. 2016;12:114. DOI 10.1007/s11295-016-1075-y.
- Ebrahimi A., Zarei A., Fardadonbeh M.Z., Lawson S. Evaluation of genetic variability among "Early Mature" *Juglans regia* using mic-

- rosatellite markers and morphological traits. *PeerJ*. 2017a;5:e3834. DOI 10.7717/peerj.3834.
- Ebrahimi A., Zarei A.K., McKennan J.R., Bujdoso G., Woeste K.E. Genetic diversity of Persian walnut (*Juglans regia*) in the cold-temperate zone of the United States and Europe. *Sci. Hortic*. 2017b;220:36-41. DOI 10.1016/j.scienta.2017.03.030
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Gaisberger H., Legay S., Loo A.C.J., Azimov R., Aaliev S., Bobokalov F., Mukhsimov N., Kettle C., Vinceti B. Diversity under threat: connecting genetic diversity and threat mapping to set conservation priorities for *Juglans regia* L. populations in Central Asia. *Front. Ecol. Evol.* 2020;8:171. DOI 10.3389/fevo.2020.00171.
- Guney M., Kafkas S., Keles H., Zarifikhosroshahi M., Gundesli M.A., Ercisli S., Necas T., Bujdoso G. Genetic diversity among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by SSR markers. *Sustainability*. 2021;13(12):6830. DOI 10.3390/su13126830.
- Gunn B.F., Aradhya M., Salick J.M., Miller A.J., Yongping Y., Lin L., Xian H. Genetic variation in walnuts (*Juglans regia* and *J. sigillata*; Juglandaceae): species distinctions, human impacts, and the conservation of agrobiodiversity in Yunnan, China. *Am. J. Bot.* 2010; 97(4):660-671. DOI 10.3732/ajb.0900114.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):1-9.
- Ikhana A.S., Topc H., Sütyemez M., Kafkas S. Novel 307 polymorphic SSR markers from BAC-end sequences in walnut (*Juglans regia* L.): effects of motif types and repeat lengths on polymorphism and genetic diversity. *Sci. Hortic*. 2016;213:1-4. DOI 10.1016/j.scienta.2016.10.006.
- Karimi R., Ershadi A., Ehtesham Nia A., Sharifani M., Rasouli M., Ebrahimi A., Vahdati K. Morphological and molecular evaluation of Persian walnut populations in Northern and Western regions of Iran. *J. Nuts*. 2014;5(2):21-31. DOI 10.22034/JON.2014.515686.
- Magige E.A., Fan P.-Z., Wambulwa M.C., Milne R., Wu Z.-Y., Luo Y.-H., Khan R., Wu H.-Y., Qi H.-L., Zhu G.-F., Maity D., Khan I., Gao L.-M., Liu J. Genetic diversity and structure of Persian walnut (*Juglans regia* L.) in Pakistan: implications for conservation. *Plants*. 2022;11(13):1652. DOI 10.3390/plants11131652.
- Orhan E., Eydurán S.P., Poljuha D., Akin M., Weber T., Ercisli S. Genetic diversity detection of seed-propagated walnut (*Juglans regia* L.) germplasm from Eastern Anatolia using SSR markers. *Folia Hort.* 2020;32(1):1-10. DOI 10.2478/fhort-2020-0004.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pollegioni P., Woeste K., Major A., Scarascia G., Malvolti M. Characterization of *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) and *Juglans × intermedia* (Carr.) by SSR markers: a case study in Italy. *Silvae Genet.* 2009;58(1):68-78. DOI 10.1515/sg-2009-0009.
- Pollegioni P., Woeste K., Olimpieri I., Marandola D., Cannata F., Malvolti M.E. Long-term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR marker. *Tree Genet. Genomes*. 2011;7:707-723. DOI 10.1007/s11295-011-0368-4.
- Pollegioni P., Woeste K.E., Chiocchini F., Olimpieri I., Tortolano V., Clark J., Hemery G.E., Mapelli S., Malvolti M.E. Landscape genetics of Persian walnut (*Juglans regia* L.) across its Asian range. *Tree Genet. Genomes*. 2014;10:1027-1043. DOI 10.1007/s11295-014-0740-2.
- Pollegioni P., Woeste K.E., Chiocchini F., Del Lungo S., Olimpieri I., Tortolano V., Clark J., Hemery G.E., Mapelli S., Malvolti M.E. Ancient humans influenced the current spatial genetic structure of common walnut populations in Asia. *PLoS One*. 2015;10(9):e0135980. DOI 10.1371/journal.pone.0135980.
- Pollegioni P., Woeste K., Chiocchini F., Del Lungo S., Ciolfi M., Olimpieri I., Tortolano V., Clark J., Hemery G.E., Mapelli S., Malvolti M. Rethinking the history of common walnut (*Juglans regia* L.) in Europe: its origins and human interactions. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172541. DOI 10.1371/journal.pone.0172541.
- Pop I.F., Vicol A.C., Botu M., Raica P.A., Vahdati K., Pamfil D. Relationships of walnut cultivars in a germplasm collection: comparative analysis of phenotypic and molecular data. *Sci. Hortic*. 2013;153:124-135. DOI 10.1016/j.scienta.2013.02.013.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant. Mol. Biol.* 1985;5:69-76. DOI 10.1007/BF00020088.
- Roor D.W., Konrad H., Mamadjanov D., Geburek T. Population differentiation in common walnut (*Juglans regia* L.) across major parts of its native range – insights from molecular and morphometric data. *J. Hered.* 2017;108(4):391-404. DOI 10.1093/jhered/esw122.
- Shah U.N., Mir J.I., Ahmed N., Fazili K.M. Assessment of germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes through microsatellite markers. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 2018;17(4):339-350. DOI 10.1016/j.jssas.2016.07.005.
- Shamlu F., Rezaei M., Lawson S., Ebrahimi A., Biabani A., Khan-Ahmadi A. Genetic diversity of superior Persian walnut genotypes in Azadshahr, Iran. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2018;24(5):939-949. DOI 10.1007/s12298-018-0573-9.
- Topcu H., Ikhana A.S., Sütyemez M., Güneya N.M., Kafkas S. Development of 185 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from walnut (*Juglans regia* L.). *Sci. Hortic*. 2015;194:160-167. DOI 10.1016/j.scienta.2015.08.014.
- Vahdati K., Arab M.M., Sarikhani S., Sadat-Hosseini M., Leslie C.A., Brown P.J. Advances in Persian walnut (*Juglans regia* L.) breeding strategies. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.) *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops*. Cham: Springer, 2019;401-472. DOI 10.1007/978-3-030-23112-5_11.
- Vischi M., Chiabà C., Raranciuc S., Poggetti L., Messina R., Ermarcora P., Cipriani G., Paffetti D., Vettori C., Testolin R. Genetic diversity of walnut (*Juglans regia* L.) in the Eastern Italian Alps. *Forests*. 2017;8(3):81. DOI 10.3390/f8030081.
- Wang H., Pan G., Ma Q., Zhang J., Pei D. The genetic diversity and introgression of *Juglans regia* and *Juglans sigillata* in Tibet as revealed by SSR markers. *Tree Genet. Genomes*. 2015;11:804. DOI 10.1007/s11295-014-0804-3.
- Woeste K., Burns R., Rhodes O., Michler C. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. *J. Hered.* 2002;93:58-60. DOI 10.1093/jhered/93.1.58.
- Zhou H., Zhao P., Woeste K., Zhang S. Gene flow among wild and cultivated common walnut (*Juglans regia*) trees in the Qinling Mountains revealed by microsatellite markers. *J. For. Res.* 2021;32(5):2189-2201. DOI 10.1007/s11676-020-01254-z.

ORCID ID

I.I. Suprun orcid.org/0000-0003-0355-8395
I.V. Stepanov orcid.org/0000-0002-6251-300X

Благодарности. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-16-20061, <https://rscf.ru/en/project/22-16-20061/>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.12.2022. После доработки 19.04.2023. Принята к публикации 20.04.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Гены-кандидаты доместикации и устойчивости к холоду по данным полногеномного секвенирования российских пород крупного рогатого скота и овец

Н.С. Юдин¹, Д.М. Ларкин²✉

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Королевский Ветеринарный Колледж, Университет Лондона, Лондон, Великобритания

✉ dmlarkin@gmail.com

Аннотация. Известно, что различные виды животных при обитании в одинаковых условиях среды могут сформировать сходные фенотипы. Изучение конвергентной эволюции нескольких видов под действием одного и того же средового фактора позволяет выявить у них общие механизмы генетической адаптации. Местные породы крупного и мелкого рогатого скота формировались на протяжении тысяч лет под воздействием доместикации, а также отбора, направленного на адаптацию к факторам местной среды обитания и удовлетворение потребностей человека. Ранее нами был выявлен ряд генов-кандидатов в участках генома, подвергшихся отбору в ходе доместикации и адаптации к климатическим условиям России, включая низкие зимние температуры, у местных пород крупного рогатого скота (КРС) и овец с использованием данных полногеномного секвенирования. Однако эти данные обладают низким разрешением и не позволяют выявить большинство нуклеотидных замен. Целью работы было создание по данным полногеномного секвенирования списка генов, связанных с адаптацией российских пород КРС и овец, а также идентификация генов-кандидатов и метаболических путей для проведения селекции на адаптацию к холоду. Использованы опубликованные нами данные по поиску следов отбора в геномах российских или разводимых в России пород КРС (якутская, холмогорская, бурятская, вагю) и овец (забайкальская, тувинская). Количество генов-кандидатов в районах, потенциально подвергавшихся селекции, составило 946 у КРС и 151 у овец. Нами показано, что изученные российские породы КРС и овец имеют не менее 10 общих генов под отбором, по-видимому, участвующих в процессах адаптации/селекции, в том числе адаптации к холодному климату, включая гены *ASTN2*, *PM20D1*, *TMEM176A*, *GLIS1*. На основании пересечения со списком генов, подвергавшихся отбору по крайней мере у двух видов арктических/антарктических млекопитающих, у КРС и овец выявлено 20 и 8 генов соответственно, которые потенциально вовлечены в адаптацию к холоду. Среди них наиболее перспективными для дальнейших исследований являются *ASPH*, *NCKAP5L*, *SERPINF1* и *SND1*. Анализ генных онтологий указывает на существование возможных общих биохимических путей адаптации к холоду у домашних и диких млекопитающих, связанных с разборкой цитоскелета и апоптозом.

Ключевые слова: признаки селекции; адаптация; холод; крупный рогатый скот; овца; местная порода; Россия; полногеномное секвенирование.

Для цитирования: Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Гены-кандидаты доместикации и устойчивости к холоду по данным полногеномного секвенирования российских пород крупного рогатого скота и овец. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):463-470. DOI 10.18699/VJGB-23-56

Candidate genes for domestication and resistance to cold climate according to whole genome sequencing data of Russian cattle and sheep breeds

N.S. Yudin¹, D.M. Larkin²✉

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

✉ dmlarkin@gmail.com

Abstract. It is known that different species of animals, when living in the same environmental conditions, can form similar phenotypes. The study of the convergent evolution of several species under the influence of the same environmental factor makes it possible to identify common mechanisms of genetic adaptation. Local cattle and sheep breeds have been formed over thousands of years under the influence of domestication, as well as selection aimed at adaptation to the local environment and meeting human needs. Previously, we identified a number of candidate genes in genome regions potentially selected during domestication and adaptation to the climatic conditions of Russia, in local breeds of cattle and sheep using whole genome genotyping data. However, these data are of low

resolution and do not reveal most nucleotide substitutions. The aim of the work was to create, using the whole genome sequencing data, a list of genes associated with domestication, selection and adaptation in Russian cattle and sheep breeds, as well as to identify candidate genes and metabolic pathways for selection for cold adaptation. We used our original data on the search for signatures of selection in the genomes of Russian cattle (Yakut, Kholmogory, Buryat, Wagyu) and sheep (Baikal, Tuva) breeds. We used the HapFLK, DCMS, FST and PBS methods to identify DNA regions with signatures of selection. The number of candidate genes in potentially selective regions was 946 in cattle and 151 in sheep. We showed that the studied Russian cattle and sheep breeds have at least 10 genes in common, apparently involved in the processes of adaptation/selection, including adaptation to a cold climate, including the *ASTN2*, *PM20D1*, *TMEM176A*, and *GLIS1* genes. Based on the intersection with the list of selected genes in at least two Arctic/Antarctic mammal species, 20 and 8 genes, have been identified in cattle and sheep, respectively, that are potentially involved in cold adaptation. Among them, the most promising for further research are the *ASPH*, *NCKAP5L*, *SERPINF1*, and *SND1* genes. Gene ontology analysis indicated the existence of possible common biochemical pathways for adaptation to cold in domestic and wild mammals associated with cytoskeleton disassembly and apoptosis.

Key words: signatures of selection; adaptation; cold; cattle; sheep; local breed; Russia; whole genome sequencing.

For citation: Yudin N.S., Larkin D.M. Candidate genes for domestication and resistance to cold climate according to whole genome sequencing data of Russian cattle and sheep breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):463-470. DOI 10.18699/VJGB-23-56

Введение

Воздействие экстремальных внешних факторов приводит либо к вымиранию вида, либо к его адаптации к новым условиям среды (Nevo, 2011). Известно, что различные виды животных при обитании в одинаковых условиях могут сформировать сходные фенотипы, используя схожие биохимические пути (Storz, 2016). Изучение конвергентной эволюции нескольких видов под действием одного и того же средового фактора позволяет выявить у них общие механизмы генетической адаптации к нему (Romashov et al., 2022).

Например, одна и та же несинонимичная мутация в гене родопсина независимо возникла и подвергалась отбору по крайней мере у 20 видов рыб при изменении освещенности в воде (Hill et al., 2019). Одни и те же конвергентные замены аминокислот произошли в гене престилина у китов и летучих мышей при возникновении эхолокации (Liu Y. et al., 2010). Несинонимичная замена His207Arg в гене рецептора меланокортина 1 ассоциирована со светлым окрасом оперения у красноногих олуш и турухтанов (Lamichhane et al., 2016). Наша недавняя работа по самому северному крупному рогатому скоту из Сибири (якутскому) выявила феномен конвергентной нуклеотидной эволюции у пород домашних животных и диких видов, живущих в сходных суровых условиях и/или проявляющих сходные фенотипы. Мы обнаружили одинаковую замену аминокислоты в белке NRAP у якутского скота и 16 видов зимующих или впадающих в оцепенение, адаптированных к холоду и глубоководных млекопитающих, которая отсутствовала у всех других пород крупного рогатого скота и других видов Bovinae из набора данных проекта «1000 геномов быков» (Buggiotti et al., 2021). По нашим сведениям, эта аминокислотная замена, по-видимому, возникла 500–800 лет назад и почти зафиксировалась в современной популяции якутского скота.

Одомашнивание (доместикация) животных разных видов сопровождается целым рядом сходных морфофизиологических и поведенческих изменений (Belyaev, 1979; Wilkins et al., 2014). Например, одним из характерных морфологических признаков доместикации являются на-

рушение синтеза меланина, а также замедление развития меланоцитов, приводящие к появлению белых пятен на теле вплоть до возникновения однородной белой окраски (Прасолова, Трут, 1993). Такой фенотипический параллелизм наблюдается у крупного рогатого скота (КРС), лошадей, свиней, собак, кошек, норок, кур, голубей и т. д. (Larkin, Yudin, 2016). Действительно, при исследовании геномов популяций домашних животных были обнаружены сильные сигналы отбора в генах метаболического пути меланина (*KIT*, *KITLG*, *MITF*, *PAX3*) (Cieslak et al., 2011).

Локальные породы крупного и мелкого рогатого скота формировались в течение тысяч лет под воздействием доместикации, а также естественного и искусственного отбора, направленного на адаптацию к факторам местной среды обитания и удовлетворение потребностей человека (Моисеева и др., 2006; Kantanen et al., 2015). Изучение геномов местных пород скота позволяет установить генетические механизмы адаптации, в том числе к низкой температуре окружающей среды (Юдин и др., 2021). Ранее мы выявили ряд генов-кандидатов в участках генома, потенциально подвергавшихся отбору в ходе доместикации и адаптации к суровым климатическим условиям России, у местных пород КРС (*Bos taurus*) и овец (*Ovis aries*) с использованием данных полногеномного генотипирования на стандартных чипах (Yurchenko et al., 2018, 2019). На основании этих результатов нами был идентифицирован 31 общий ген-кандидат, связанный с адаптацией к окружающей среде, включая холодный климат, у животных изученных пород (Юдин, Ларкин, 2019). Например, ген *NEB*, вероятно, связанный с выработкой тепла посредством сократительного термогенеза, обнаружен нами в районах генома, подвергавшихся позитивному отбору, как у исконно российских пород КРС и овец, так и у мамонта, белого медведя и полярного кита.

Однако данные полногеномного генотипирования обладают низким разрешением и не позволяют выявить большинство нуклеотидных замен в геномах разных видов сельскохозяйственных животных. Целью работы было создание списка общих генов, связанных с адаптацией к окружающей среде у российских пород КРС и овец,

а также идентификация перспективных генетических вариантов/генов-кандидатов/метаболических путей для дальнейших экспериментов и проведения маркер-ориентированной и геномной селекции, направленной на адаптацию к холоду у сельскохозяйственных животных, с использованием данных полногеномного секвенирования. Ранее следы отбора в этих же образцах ДНК от якутского, холмогорского и бурятского скота были проанализированы нами с помощью генотипирования на чипах GeneSeek Genomic Profiler High-Density, содержащих около 139 тысяч SNP (Yurchenko et al., 2018), а от забайкальских и тувинских овец – на чипах Ovine Infinium HD SNP BeadChip (Yurchenko et al., 2019).

Материалы и методы

В работе использованы собственные опубликованные данные по поиску следов отбора с помощью полногеномного секвенирования в геномах российских или разводимых в России пород КРС (якутская, холмогорская, бурятская, вагю) (Buggiotti et al., 2021; Igoshin et al., 2023) и овец (забайкальская, тувинская) (Sweet-Jones et al., 2021). Высокопроизводительное секвенирование проведено в режиме парноконцевых прочтений (150 п. н. + 150 п. н.) на платформе Illumina в компании Novogene Co., Ltd. (Гонконг, КНР) для 20 животных на породу. Средняя глубина покрытия составила не менее 11x для КРС и 15x для овец.

Для идентификации районов, которые потенциально находились под действием отбора, в геномах бурятского скота и вагю мы использовали четыре взаимодополняющих метода (Igoshin et al., 2023). Метод hapFLK основан на статистике, которая учитывает структуру гаплотипов в популяциях (Fariello et al., 2013). Метод DCMS объединяет в себе пять полногеномных статистик: индекс фиксации Фишера (FST), гомозиготность гаплотипов (H1), модифицированную статистику гомозиготности гаплотипов (H12), индекс Таджимы (D) и индекс нуклеотидного разнообразия (Pi) (Ma et al., 2015). Метод FST идентифицирует области генома, попавшие под влияние отбора, путем выявления участков ДНК, которые имеют высокую вариабельность частот аллелей между сравниваемыми популяциями (Porto-Neto et al., 2013). Статистика PBS использует попарные значения FST между тремя популяциями для количественной оценки дифференциации последовательностей (Yi et al., 2010). Считается, что гены с большой дифференциацией между последовательностями потенциально могли подвергаться положительному отбору. Списки генов-кандидатов для дальнейшего анализа бурятского скота и вагю составляли путем объединения списков, полученных разными методами. Идентификацию потенциальных районов отбора в геномах якутской и холмогорской породы КРС проводили с помощью статистики hapFLK (Buggiotti et al., 2021). Для поисков следов отбора в геномах забайкальских и тувинских овец использовали вычислительный конвейер на основе метода DCMS (Yurchenko et al., 2019).

Идентификаторы генов в базе Ensembl преобразовывали в символы генов с помощью инструмента db2db ([http://biobdnet.abcc.ncifcrf.gov/db/db2dbRes.php?input=inputType&outputs\[\]=outputType&idList=value\(s\)](http://biobdnet.abcc.ncifcrf.gov/db/db2dbRes.php?input=inputType&outputs[]=outputType&idList=value(s))). Пересечения между списками генов анализировали с помо-

щью программы Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Биологические функции общих генов, которые подвергались отбору у российских пород КРС, овец и арктических/антарктических млекопитающих, анализировали с помощью веб-инструмента DAVID (Huang et al., 2009). Нами были выявлены обогащенные, по сравнению с контрольным списком всех генов человека, термины GO из категории биологических процессов (GOTERM_BP_ALL), ассоциированные с четырьмя и более генами. В качестве порогового значения критерия, характеризующего статистическую значимость превышения (обогащения) наблюдаемого числа генов с конкретным термином GO по сравнению с ожидаемым числом генов из контрольного списка, принимали $p < 0.05$.

Результаты

Количество генов-кандидатов в районах, потенциально подвергавшихся селекции, составило 946 у четырех российских пород КРС (список *List_Cattle*, Приложение 1)¹ и 151 у двух российских пород овец (список *List_Sheep*, Приложение 2) (см. таблицу). Различие в количестве генов-кандидатов между видами, вероятно, связано с различиями в количестве включенных в анализ пород, а также с числом статистических методов, использованных для поиска следов отбора (четыре статистики для бурятского скота и вагю, для остальных пород – одна). Анализ пересечения списков показал, что 10 генов потенциально могли подвергаться отбору у обоих видов (см. рисунок, список *Cattle_Sheep*, Приложение 3).

Ранее путем пересечения списков генов, потенциально подвергавшихся отбору, у шести арктических и антарктических видов млекопитающих мы составили список, объединяющий гены, которые могут участвовать в адаптации к холоду (Yudin et al., 2017). Список содержал 416 генов, которые, вероятно, подвергались отбору по крайней мере у двух видов млекопитающих (список *List_Mammals*, Приложение 4). Чтобы идентифицировать общие гены, которые могут быть связаны с адаптацией к холодному климату у российских пород КРС и овец, мы сравнили списки *List_Mammals*, *List_Cattle* и *List_Sheep*. В результате мы обнаружили 20 (список *Cattle_Mammals*, Приложение 5) и 8 (список *Sheep_Mammals*, Приложение 6) генов, которые потенциально подвергались отбору по крайней мере у двух видов диких млекопитающих, адаптированных к холодному климату, а также у КРС и овец соответственно (см. рисунок).

Чтобы проверить гипотезу о том, что эти списки были обогащены функциональными категориями генов, связанных с адаптацией к холоду, мы провели анализ генных онтологий (GO) в списке из 38 генов, полученном объединением списков *Cattle_Sheep*, *Cattle_Mammals* и *Sheep_Mammals* (список *Cattle_Sheep_Mammals*, Приложение 7). В результате мы обнаружили статистически значимое обогащение по восьми GO терминам, которые были ассоциированы с четырьмя и более генами (Приложение 8).

¹ Приложения 1–8 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx16.pdf>

Списки генов-кандидатов, потенциально подвергавшихся отбору

Название списка в Приложении	Описание	Число генов	Литературный источник
<i>List_Cattle</i> (Приложение 1)	Гены в районах возможной селекции у четырех российских пород КРС	946	Buggiotti et al., 2021; Igoshin et al., 2023
<i>List_Sheep</i> (Приложение 2)	Гены в районах возможной селекции у двух российских пород овец	151	Sweet-Jones et al., 2021
<i>Cattle_Sheep</i> (Приложение 3)	Список общих генов, которые потенциально подвергались отбору у российских пород КРС и овец	10	–
<i>List_Mammals</i> (Приложение 4)	Список генов, которые потенциально подвергались отбору по крайней мере у двух видов арктических/антарктических млекопитающих	416	Yudin et al., 2017
<i>Cattle_Mammals</i> (Приложение 5)	Список общих генов, которые потенциально подвергались отбору хотя бы у одной российской породы КРС, а также по крайней мере у двух видов арктических/антарктических млекопитающих	20	–
<i>Sheep_Mammals</i> (Приложение 6)	Список общих генов, которые потенциально подвергались отбору хотя бы у одной российской породы овец, а также по крайней мере у двух видов арктических/антарктических млекопитающих	8	–
<i>Cattle_Sheep_Mammals</i> (Приложение 7)	Список генов, которые потенциально подвергались отбору у российских пород КРС, овец, а также арктических/антарктических млекопитающих, – объединение списков <i>Cattle_Sheep</i> , <i>Cattle_Mammals</i> и <i>Sheep_Mammals</i>	38	–

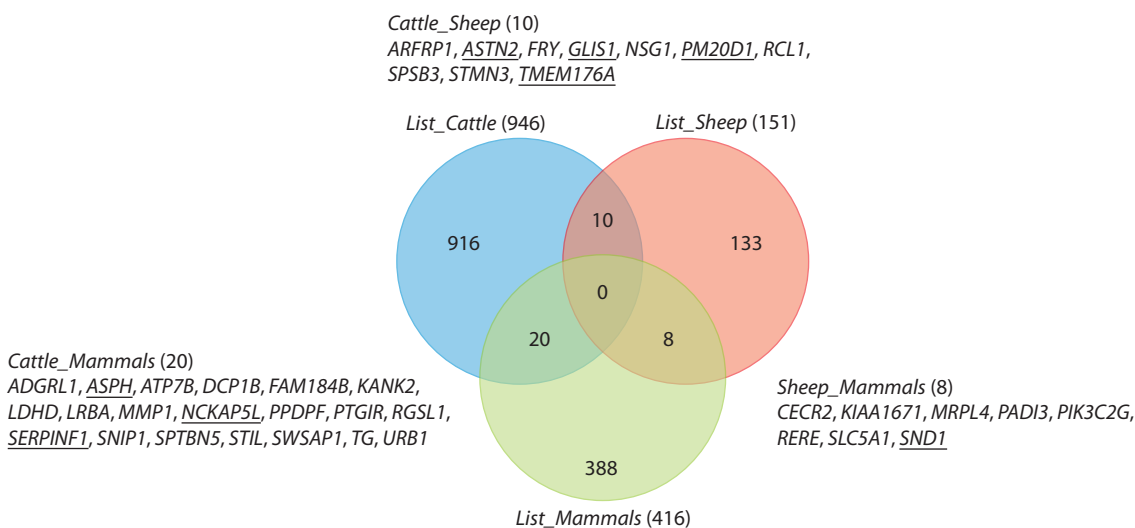


Диаграмма Венна, отражающая перекрытия между списками генов, вероятно, подвергавшихся отбору в геномах российских пород крупного рогатого скота (*List_Cattle*), овец (*List_Sheep*) и как минимум двух видов арктических/антарктических млекопитающих (*List_Mammals*).

В скобках приведено количество генов в списке. Наиболее перспективные гены-кандидаты холодовой адаптации (исходя из их биологической роли) выделены подчеркиванием.

Обсуждение

Наше исследование было направлено на идентификацию общих генов-кандидатов в геномах отечественных пород КРС и овец, которые могли подвергаться отбору и участвовать в адаптации к экстремальному климату, а также на выявление перспективных генетических вариантов/генов-кандидатов/метаболических путей для дальнейших исследований адаптации к холоду. Мы идентифицировали всего 10 генов, которые потенциально могли находиться под влиянием отбора одновременно у российских пород КРС и у овец (список *Cattle_Sheep*, см. Приложение 3). По-видимому, эти гены подвергались отбору в ходе доме-

стикации и/или при последующей селекции хозяйственно важных признаков, а также в ходе адаптации к холодному климату.

Согласно теории Д.К. Беляева, многочисленные морфофизиологические преобразования у домашних животных вызваны дестабилизирующим отбором на отсутствие агрессивного поведения по отношению к человеку (Беляев, 1979). Действительно, ранее нами было показано, что список из 1262 общих генов, которые подвергались отбору у российских пород КРС и овец по данным полногеномного генотипирования, обогащен генами, преиму-

щественно экспрессирующимися в мозге (Юдин, Ларкин, 2019). Ряд общих генов, обнаруженных в нашем исследовании (см. Приложение 3), экспрессируются в нервной ткани и обеспечивают нормальное функционирование нейронов. Например, белок астротактина 2 (*ASTN2*) модулирует синаптическую активность нейронов посредством регуляции экспрессии синаптических белков в постмигранционных нейронах с помощью эндоцитоза (Behesti et al., 2018). Генетические варианты в гене *ASTN2* ассоциированы с болезнью Альцгеймера (Wang et al., 2015), шизофренией (Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium, 2017), аутизмом (Lionel et al., 2014) и другими психиатрическими заболеваниями. Ген белка, содержащего пептидазный домен M20 1 (*PM20D1*), ассоциирован с болезнью Альцгеймера (Sanchez-Mut et al., 2018) и болезнью Паркинсона (Rudakou et al., 2021), а ген трансмембранного белка *TMEM176A* – с шизофренией (Kos et al., 2017).

В то же время делеция в гене *ASTN2* приводит к смене нормальной ориентации волосных фолликулов у взрослых мышей (параллельно «от головы к хвосту») на противоположную (параллельно «от хвоста к голове») (Chang et al., 2015). У человека ген *ASTN2* ассоциирован с уровнем триглицеридов в крови (Jiao et al., 2015) и развитием ожирения (Burt et al., 2021). Следы отбора в этом гене были обнаружены у народностей южной Эфиопии, более тысячи лет проживающих в условиях высокогорья (Scheinfeldt et al., 2012). Интересно, что в гене *ASTN2* у населения Южной Азии была выявлена, по-видимому, адаптивная интрогрессия большого числа древних аллелей неандертальцев (Rasimo et al., 2017). Биохимический путь *PM20D1* модулирует накопление бурого жира и таким образом участвует в процессе выработки тепла посредством несократительного термогенеза (Gao et al., 2018). Проадипогенный фактор *GLIS1* может играть критическую роль в дифференцировке мезодермальных клеток при развитии плода и влиять на распределение жира в хвосте у овец (Luo et al., 2021). SNP полиморфизм в гене *NSG1* ассоциирован с содержанием жира в молоке у коров голштинской породы (Lee et al., 2016).

Мы исследовали перспективные генетические варианты и гены-кандидаты адаптации к холоду путем пересечения списков *List_Cattle* и *List_Sheep* со списком *List_Mammals* из 416 генов, которые подвергались позитивному отбору по крайней мере у двух видов арктических/антарктических млекопитающих (Юдин et al., 2017). При пересечении всех трех списков не выявлено общих генов и генетических вариантов (см. рисунок), однако мы идентифицировали 20 и 8 генов (см. Приложения 5 и 6), которые потенциально подвергались отбору в ходе адаптации к климату как у двух видов арктических млекопитающих, так и у КРС или овец соответственно.

Так, генетические варианты в гене *ASPH*, который кодирует белок, регулирующий процесс возбуждения–сокращения в мышцах, у человека ассоциирован с тепловым ударом и злокачественной гипертермией (Endo et al., 2022). По данным полногеномного анализа ассоциаций, однонуклеотидные полиморфизмы в этом гене ассоциированы с распределением внутримышечного жира у мясного скота (Ramayo-Caldas et al., 2014). Генетические варианты

в генах *NCKAP5L* (Chen et al., 2013) и *SERPINF1* (Böhm et al., 2012) связаны с развитием ожирения у человека. Ген *FAM184B* у людей ассоциирован с композицией тела и профилем жирных кислот (Yuan et al., 2021). Белковый продукт гена *PADI3* контролирует форму волос на голове у человека (Liu F. et al., 2018). Экспрессия мРНК гена белка, содержащего домен стафилококковой нуклеазы 1 (*SND1*), у новозеландского палочника значительно увеличивается при воздействии холода (Dunning et al., 2013). У млекопитающих *SND1* играет важную роль в регуляции липидного метаболизма посредством активации белка *SREBP2* (Navarro-Imaz et al., 2020).

Термины генной онтологии, выявленные программой DAVID при анализе списка генов, которые потенциально подвергались отбору у русских пород КРС, овец, а также арктических/антарктических млекопитающих (список *Cattle_Sheep_Mammals*), можно разделить на три группы: 1) термины, связанные с разборкой частей клетки и белковых комплексов («разборка клеточных компонентов», «разборка белкового комплекса», «разборка макромолекулярного комплекса» и т.д.); 2) термины, связанные с дезинтеграцией ДНК («гидролиз фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот»); 3) малоинформативные термины верхнего уровня иерархии, описывающие общие биологические процессы («биологический процесс, происходящий на уровне многоклеточного организма») (см. Приложение 8).

Обогащение терминами генной онтологии, связанными с разборкой частей клетки, белков и ДНК, может быть результатом естественного отбора по генам, кодирующим белки цитоскелета и/или участвующим в регуляции программируемой клеточной гибели (апоптоза). Так, исследования на впадающих в спячку млекопитающих показали, что их клетки отвечают на воздействие низких температур разборкой цитоскелета и задержкой апоптоза (Van Breukelen, Martin, 2002). Считается, что именно разборка цитоскелета может быть причиной подавления синтеза белка в клетках млекопитающих при холодовом стрессе (Al-Fageeh, Smales, 2006). Гипотермия вызывает разборку микротрубочек путем активации киназы p38 MAP в клетках сетчатки человека (Thanuja et al., 2021). В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что микротрубочки в периферических аксонах ксенопуса чувствительны к холоду и плотность их варьирует в зависимости от сезона года (Alvarez, Fadić, 1992). Холодовой стресс индуцирует апоптоз нейронов в гиппокампе мышей (Xu et al., 2019).

В нашем исследовании, например, с термином «разборка клеточных компонентов» было ассоциировано семь генов (см. Приложение 8). Среди них ген *SPTBN5* кодирует один из белков семейства спектринов, которые являются обычными компонентами цитоскелета, связываясь с элементами клеточного каркаса и плазматической мембраной, обеспечивая правильную локализацию основных мембранных белков, передачу сигнала внутрь клетки и другие процессы (Beijer, Züchner, 2022). Белок *NCKAP5L*, связываясь с белком *CDK5RAP2*, регулирует стабильность микротрубочек в клетках HeLa (Mori et al., 2015). Белок статмин-3, кодируемый геном *STMN3*, воздействуя на баланс сборки и разборки микротрубочек,

регулирует процессы быстрой перестройки цитоскелета в ответ на внешние факторы среды (Naig et al., 2014). С термином «гидролиз фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот» были ассоциированы гены *RCL1*, *CECR2*, *SND1* и *DCPIB* (см. Приложение 8). Доказано, что белок SND1 подавляет апоптоз в клетках гепатоцеллюлярной карциномы посредством взаимодействия с длинной некодирующей РНК UCA1 (Cui et al., 2018). Белок CECR2 в апоптотических клетках печени человека локализован в районах конденсации ДНК и взаимодействует с хроматин-ассоциированным белком TAFII30 (Liu L. et al., 2002).

Заключение

С использованием данных полногеномного секвенирования нами показано, что изученные российские породы КРС и овец имеют не менее 10 общих генов, по-видимому, участвующих в процессах адаптации/селекции, в том числе адаптации к холодному климату, включая гены *ASTN2*, *PM20D1*, *TMEM176A*, *GLIS1*. На основании пересечения со списком генов, подвергавшихся отбору по крайней мере у двух видов арктических млекопитающих, у КРС и овец выявлено 20 и 8 генов соответственно, которые потенциально вовлечены в адаптацию к холоду. Среди них наиболее перспективными для дальнейших исследований являются гены *ASPH*, *NCKAP5L*, *SERPINF1* и *SND1*. Анализ геновых онтологий указывает на существование возможных общих биохимических путей адаптации к холоду у домашних и диких млекопитающих, связанных с разборкой цитоскелета и апоптозом.

Список литературы / References

- Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А., Сулимова Г.Е., Каштанов С.Н. Генофонды сельскохозяйственных животных. Генетические ресурсы животноводства России. М.: Наука, 2006. [Moiseeva I.G., Ukhanov S.V., Stolpovsky Yu.A., Sulimova G.E., Kashtanov S.N. Gene Pools of Farm Animals. Livestock Genetic Resources in Russia. Moscow: Nauka Publ., 2006. (in Russian)]
- Прасолова Л.А., Трут Л.Н. Эффект гена “Star” на скорость миграции меланобластов у эмбрионов серебристо-черных лисич (*Vulpes vulpes*). Докл. РАН. 1993;329(6):787-789. [Prasolova L.A., Trut L.N. The effect of the Star gene on the rate of melanoblast migration in silver fox embryos. Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 1993;329(6):787-789. (in Russian)]
- Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Общие признаки селекции и гены, связанные с адаптацией и акклиматизацией, в геномах российских пород крупного рогатого скота и овец. Генетика. 2019;55(8): 936-943. DOI 10.1134/S0016675819070154. [Yudin N.S., Larkin D.M. Shared signatures of selection related to adaptation and acclimation in local cattle and sheep breeds from Russia. Russ. J. Genet. 2019;55(8):1008-1014. DOI 10.1134/S1022795419070159.]
- Юдин Н.С., Юрченко А.А., Ларкин Д.М. Следы отбора и гены-кандидаты адаптации к экстремальным факторам среды в геномах турано-монгольских пород крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023. [Yudin N.S., Yurchenko A.A., Larkin D.M. Signatures of selection and candidate genes for adaptation to extreme environmental factors in the genomes of Turano-Mongolian cattle breeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2021;25(2):190-201. DOI 10.18699/VJ21.023. (in Russian)]
- Al-Fageeh M.B., Smales C.M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. Biochem. J. 2006;397(2):247-259. DOI 10.1042/BJ20060166.
- Alvarez J., Fadić R. Assembly and disassembly of axonal microtubules of the toad *Xenopus laevis* under the effect of temperature. J. Exp. Zool. 1992;264(3):261-266. DOI 10.1002/jez.1402640305.
- Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. Mol. Autism. 2017;8:21. DOI 10.1186/s13229-017-0137-9.
- Behesti H., Fore T.R., Wu P., Horn Z., Leppert M., Hull C., Hatten M.E. ASTN2 modulates synaptic strength by trafficking and degradation of surface proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018;115(41): E9717-E9726. DOI 10.1073/pnas.1809382115.
- Beijer D., Züchner S.L. Commentary: *SPTBN5*, encoding the β V-spectrin protein, leads to a syndrome of intellectual disability, developmental delay, and seizures. Front. Mol. Neurosci. 2022;15:1011856. DOI 10.3389/fnmol.2022.1011856.
- Belyaev D.K. The Wilhelmine E. Key 1978 invitational lecture. Destabilizing selection as a factor in domestication. J. Hered. 1979;70(5): 301-308. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a109263.
- Böhm A., Ordelheide A.M., Machann J., Heni M., Ketterer C., Machicao F., Schick F., Stefan N., Fritsche A., Häring H.U., Staiger H. Common genetic variation in the *SERPINF1* locus determines overall adiposity, obesity-related insulin resistance, and circulating leptin levels. PLoS One. 2012;7(3):e34035. DOI 10.1371/journal.pone.0034035.
- Buggiotti L., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Vander Jagt C.J., Vorobieva N.V., Kusliy M.A., Vasiliev S.K., Rodionov A.N., Boronetskaya O.I., Zinovieva N.A., Graphodatsky A.S., Daetwyler H.D., Larkin D.M. Demographic history, adaptation, and NRAP convergent evolution at amino acid residue 100 in the world northernmost cattle from Siberia. Mol. Biol. Evol. 2021;38(8):3093-3110. DOI 10.1093/molbev/msab078.
- Burt O., Johnston K.J.A., Graham N., Cullen B., Lyall D.M., Lyall L.M., Pell J.P., Ward J., Smith D.J., Strawbridge R.J. Genetic variation in the *ASTN2* locus in cardiovascular, metabolic and psychiatric traits: evidence for pleiotropy rather than shared biology. Genes (Basel). 2021;12(8):1194. DOI 10.3390/genes12081194.
- Chang H., Cahill H., Smallwood P.M., Wang Y., Nathans J. Identification of *Astroctactin2* as a genetic modifier that regulates the global orientation of mammalian hair follicles. PLoS Genet. 2015;11(9): e1005532. DOI 10.1371/journal.pgen.1005532.
- Chen J., Meng Y., Zhou J., Zhuo M., Ling F., Zhang Y., Du H., Wang X. Identifying candidate genes for Type 2 Diabetes Mellitus and obesity through gene expression profiling in multiple tissues or cells. J. Diabetes Res. 2013;2013:970435. DOI 10.1155/2013/970435.
- Cieslak M., Reissmann M., Hofreiter M., Ludwig A. Colours of domestication. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2011;86(4):885-899. DOI 10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.
- Cui X., Zhao C., Yao X., Qian B., Su C., Ren Y., Yao Z., Gao X., Yang J. SND1 acts as an anti-apoptotic factor via regulating the expression of lncRNA *UCA1* in hepatocellular carcinoma. RNA Biol. 2018;15(10):1364-1375. DOI 10.1080/15476286.2018.1534525.
- Dunning L.T., Dennis A.B., Park D., Sinclair B.J., Newcomb R.D., Buckley T.R. Identification of cold-responsive genes in a New Zealand alpine stick insect using RNA-Seq. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics. 2013;8(1):24-31. DOI 10.1016/j.cbd.2012.10.005.
- Endo Y., Groom L., Celik A., Kraeva N., Lee C.S., Jung S.Y., Gardner L., Shaw M.A., Hamilton S.L., Hopkins P.M., Dirksen R.T., Riazi S., Dowling J.J. Variants in *ASPH* cause exertional heat illness and are associated with malignant hyperthermia susceptibility. Nat. Commun. 2022;13(1):3403. DOI 10.1038/s41467-022-31088-8.
- Fariello M.I., Boitard S., Naya H., SanCristobal M., Servin B. Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among

- hierarchically structured populations. *Genetics*. 2013;193(3):929-941. DOI 10.1534/genetics.112.147231.
- Gao Y., Qimuge N.R., Qin J., Cai R., Li X., Chu G.Y., Pang W.J., Yang G.S. Acute and chronic cold exposure differentially affects the browning of porcine white adipose tissue. *Animal*. 2018;12(7):1435-1441. DOI 10.1017/S1751731117002981.
- Hill J., Enbody E.D., Pettersson M.E., Sprehn C.G., Bekkevold D., Folkvord A., Laikre L., Kleinau G., Scheerer P., Andersson L. Recurrent convergent evolution at amino acid residue 261 in fish rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019;116(37):18473-18478. DOI 10.1073/pnas.1908332116.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009;4(1):44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211.
- Igoshin A.V., Romashov G.A., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Larkin D.M. Resequencing commercial and locally adapted Turano-Mongolian cattle breeds reveals differences in selective pressures. *Animal Genetics*. 2023 (Submitted).
- Jiao H., Wang K., Yang F., Grant S.F., Hakonarson H., Price R.A., Li W.D. Pathway-based genome-wide association studies for plasma triglycerides in obese females and normal-weight controls. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134923. DOI 10.1371/journal.pone.0134923.
- Kantanen J., Lovendahl P., Strandberg E., Eythorsdottir E., Li M.H., Kettunen-Praebel A., Berg P., Meuwissen T. Utilization of farm animal genetic resources in a changing agro-ecological environment in the Nordic countries. *Front. Genet.* 2015;6:52. DOI 10.3389/fgene.2015.00052.
- Kos M.Z., Carless M.A., Peralta J., Curran J.E., Quillen E.E., Almeida M., Blackburn A., Blondell L., Roalf D.R., Pogue-Geile M.F., Gur R.C., Göring H.H.H., Nimgaonkar V.L., Gur R.E., Almasy L. Exome sequences of multiplex, multigenerational families reveal schizophrenia risk loci with potential implications for neurocognitive performance. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2017;174(8):817-827. DOI 10.1002/ajmg.b.32597.
- Lamichhane S., Fan G., Widemo F., Gunnarsson U., Thalman D.S., Hoepfner M.P., Kerje S., Gustafson U., Shi C., Zhang H., Chen W., Liang X., Huang L., Wang J., Liang E., Wu Q., Lee S.M., Xu X., Höglund J., Liu X., Andersson L. Structural genomic changes underlie alternative reproductive strategies in the ruff (*Philomachus pugnax*). *Nat. Genet.* 2016;48(1):84-88. DOI 10.1038/ng.3430.
- Larkin D.M., Yudin N.S. The genomes and history of domestic animals. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2016;31(4):197-202. DOI 10.3103/S0891416816040054.
- Lee Y.S., Shin D., Lee W., Taye M., Cho K., Park K.D., Kim H. The prediction of the expected current selection coefficient of single nucleotide polymorphism associated with Holstein milk yield, fat and protein contents. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016;29(1):36-42. DOI 10.5713/ajas.15.0476.
- Lionel A.C., Tammimies K., Vaags A.K., Rosenfeld J.A., Ahn J.W., Merico D., Noor A., Runke C.K., Pillalamari V.K., Carter M.T., ... Ogilvie C.M., Shen Y., Hodge J.C., Talkowski M.E., Stavropoulos D.J., Marshall C.R., Scherer S.W. Disruption of the *ASTN2/TRIM32* locus at 9q33.1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(10):2752-2768. DOI 10.1093/hmg/ddt669.
- Liu F., Chen Y., Zhu G., Hysi P.G., Wu S., Adhikari K., Breslin K., Pospiech E., Hamer M.A., Peng F., Muralidharan C., Acuna-Alonzo V., Canizales-Quinteros S., Bedoya G., Gallo C., Poletti G., Rothhammer F., Bortolini M.C., Gonzalez-Jose R., Zeng C., Xu S., Jin L., Uitterlinden A.G., Ikram M.A., van Duijn C.M., Nijsten T., Walsh S., Branicki W., Wang S., Ruiz-Linares A., Spector T.D., Martin N.G., Medland S.E., Kayser M. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 8 novel loci involved in shape variation of human head hair. *Hum. Mol. Genet.* 2018;27(3):559-575. DOI 10.1093/hmg/ddx416.
- Liu L., Amy V., Liu G., McKeehan W.L. Novel complex integrating mitochondria and the microtubular cytoskeleton with chromosome remodeling and tumor suppressor RASSF1 deduced by in silico homology analysis, interaction cloning in yeast, and colocalization in cultured cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2002;38(10):582-594. DOI 10.1290/1543-706x(2002)38<582:ncimat>2.0.co;2.
- Liu Y., Cotton J.A., Shen B., Han X., Rossiter S.J., Zhang S. Convergent sequence evolution between echolocating bats and dolphins. *Curr. Biol.* 2010;20(2):R53-R54. DOI 10.1016/j.cub.2009.11.058.
- Luo R., Zhang X., Wang L., Zhang L., Li G., Zheng Z. *GLIS1*, a potential candidate gene affect fat deposition in sheep tail. *Mol. Biol. Rep.* 2021;48(5):4925-4931. DOI 10.1007/s11033-021-06468-w.
- Ma Y., Ding X., Qanbari S., Weigend S., Zhang Q., Simianer H. Properties of different selection signature statistics and a new strategy for combining them. *Heredity (Edinb)*. 2015;115(5):426-436. DOI 10.1038/hdy.2015.42.
- Mori Y., Inoue Y., Tanaka S., Doda S., Yamanaka S., Fukuchi H., Tera-da Y. Cep169, a novel microtubule plus-end-tracking centrosomal protein, binds to CDK5RAP2 and regulates microtubule stability. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140968. DOI 10.1371/journal.pone.0140968.
- Nair S., Bora-Singhal N., Perumal D., Chellappan S. Nicotine-mediated invasion and migration of non-small cell lung carcinoma cells by modulating *STMN3* and *GSP11* genes in an ID1-dependent manner. *Mol. Cancer*. 2014;13:173. DOI 10.1186/1476-4598-13-173.
- Navarro-Imaz H., Ochoa B., Garcia-Arcos I., Martínez M.J., Chico Y., Fresnedo O., Rueda Y. Molecular and cellular insights into the role of *SND1* in lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2020;1865(5):158589. DOI 10.1016/j.bbalip.2019.158589.
- Nevo E. Evolution under environmental stress at macro- and micro-scales. *Genome Biol. Evol.* 2011;3:1039-1052. DOI 10.1093/gbe/evr052.
- Porto-Neto L.R., Lee S.H., Lee H.K., Gondro C. Detection of signatures of selection using F_{st} . In: Gondro C., van der Werf J., Hayes B. (Eds.) *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013; 1019:423-436. DOI 10.1007/978-1-62703-447-0_19.
- Racimo F., Marnetto D., Huerta-Sánchez E. Signatures of archaic adaptive introgression in present-day human populations. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34(2):296-317. DOI 10.1093/molbev/msw216.
- Ramayo-Caldas Y., Fortes M.R., Hudson N.J., Porto-Neto L.R., Bormann S., Barendse W., Kelly M., Moore S.S., Goddard M.E., Lehnert S.A., Reverter A. A marker-derived gene network reveals the regulatory role of *PPARGC1A*, *HNF4G*, and *FOXP3* in intramuscular fat deposition of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2014;92(7):2832-2845. DOI 10.2527/jas.2013-7484.
- Romashov G., Yurchenko A., Yudin N., Larkin D. How does a harsh environment make wild and domestic animals evolve similarly? In: Veerkamp R.F., de Haas Y. (Eds.) *Proceedings of 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP)*. Rotterdam, The Netherlands, 3-8 July 2022. Wageningen: Wageningen Acad. Publishers, 2022;1078-1081. DOI 10.3920/978-90-8686-940-4_255.
- Rudakou U., Yu E., Krohn L., Ruskey J.A., Asayesh F., Dauvilliers Y., Spiegelman D., Greenbaum L., Fahn S., Waters C.H., Dupré N., Rouleau G.A., Hassin-Baer S., Fon E.A., Alcalay R.N., Gan-Or Z. Targeted sequencing of Parkinson's disease loci genes highlights *SYT11*, *FGF20* and other associations. *Brain*. 2021;144(2):462-472. DOI 10.1093/brain/awaa401.
- Sanchez-Mut J.V., Heyn H., Silva B.A., Dixsaut L., Garcia-Esparcia P., Vidal E., Sayols S., Glauser L., Monteagudo-Sánchez A., Perez-Tur J., Ferrer I., Monk D., Schneider B., Esteller M., Gräff J. *PM20D1* is a quantitative trait locus associated with Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2018;24(5):598-603. DOI 10.1038/s41591-018-0013-y.
- Scheinfeldt L.B., Soi S., Thompson S., Ranciaro A., Woldemeskel D., Beggs W., Lambert C., Jarvis J.P., Abate D., Belay G., Tishkoff S.A. Genetic adaptation to high altitude in the Ethiopian highlands. *Genome Biol.* 2012;13(1):R1. DOI 10.1186/gb-2012-13-1-r1.

- Storz J.F. Causes of molecular convergence and parallelism in protein evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17(4):239-250. DOI 10.1038/nrg.2016.11.
- Sweet-Jones J., Yurchenko A.A., Igoshin A.V., Yudin N.S., Swain M.T., Larkin D.M. Resequencing and signatures of selection scan in two Siberian native sheep breeds point to candidate genetic variants for adaptation and economically important traits. *Anim. Genet.* 2021; 52(1):126-131. DOI 10.1111/age.13015.
- Thanuja M.Y., Suma B.S., Dinesh D., Ranganath S.H., Srinivas S.P. Microtubule stabilization protects hypothermia-induced damage to the cytoskeleton and barrier integrity of the corneal endothelial cells. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2021;37(7):399-411. DOI 10.1089/jop.2021.0036.
- Van Breukelen F., Martin S.L. Invited review: molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses? *J. Appl. Physiol.* 2002;92(6):2640-2647. DOI 10.1152/jappphysiol.01007.2001.
- Wang K.S., Tonarelli S., Luo X., Wang L., Su B., Zuo L., Mao C., Rubin L., Briones D., Xu C. Polymorphisms within *ASTN2* gene are associated with age at onset of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2015;122(5):701-708. DOI 10.1007/s00702-014-1306-z.
- Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T. The "domestication syndrome" in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*. 2014;197(3):795-808. DOI 10.1534/genetics.114.165423.
- Xu B., Lang L.M., Li S.Z., Guo J.R., Wang J.F., Wang D., Zhang L.P., Yang H.M., Lian S. Cortisol excess-mediated mitochondrial damage induced hippocampal neuronal apoptosis in mice following cold exposure. *Cells*. 2019;8(6):612. DOI 10.3390/cells8060612.
- Yi X., Liang Y., Huerta-Sanchez E., Jin X., Cuo Z.X., Pool J.E., Xu X., Jiang H., Vinckenbosch N., Korneliusen T.S., ... Zhang X., Li R., Li S., Yang H., Nielsen R., Wang Jun, Wang Jian. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*. 2010;329(5987):75-78. DOI 10.1126/science.1190371.
- Yuan Z., Sunduimijid B., Xiang R., Behrendt R., Knight M.I., Mason B.A., Reich C.M., Prowse-Wilkins C., Vander Jagt C.J., Chamberlain A.J., MacLeod I.M., Li F., Yue X., Daetwyler H.D. Expression quantitative trait loci in sheep liver and muscle contribute to variations in meat traits. *Genet. Sel. Evol.* 2021;53(1):8. DOI 10.1186/s12711-021-00602-9.
- Yudin N.S., Larkin D.M., Ignatieva E.V. A compendium and functional characterization of mammalian genes involved in adaptation to Arctic or Antarctic environments. *BMC Genet.* 2017;18(Suppl.1): 111. DOI 10.1186/s12863-017-0580-9.
- Yurchenko A.A., Daetwyler H.D., Yudin N., Schnabel R.D., Vander Jagt C.J., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Taylor J.F., Larkin D.M. Scans for signatures of selection in Russian cattle breed genomes reveal new candidate genes for environmental adaptation and acclimation. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12984. DOI 10.1038/s41598-018-31304-w.
- Yurchenko A.A., Deniskova T.E., Yudin N.S., Dotsev A.V., Khamiruev T.N., Selionova M.I., Egorov S.V., Reyer H., Wimmers K., Brem G., Zinovieva N.A., Larkin D.M. High-density genotyping reveals signatures of selection related to acclimation and economically important traits in 15 local sheep breeds from Russia. *BMC Genomics*. 2019;20(Suppl.3):294. DOI 10.1186/s12864-019-5537-0.

ORCID ID

Yudin N.S. orcid.org/0000-0002-1947-5554
Larkin D.M. orcid.org/0000-0001-7859-6201

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-76-20026).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.12.2022. После доработки 19.02.2023. Принята к публикации 20.02.2023.

Identification of homozygosity-rich regions in the Holstein genome

M.G. Smaragdo

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Pushkin, Russia

✉ mik7252@yandex.ru

Abstract. In this study, 371 Holstein cows from six herds and 26 Holstein bulls, which were used in these herds, were genotyped by the Illumina BovineSNP50 array. For runs of homozygosity (ROH) identification, consecutive and sliding runs were performed by the detectRUNS and Plink software. The missing calls did not significantly affect the ROH data. The mean number of ROH identified by consecutive runs was 95.4 ± 2.7 , and that by sliding runs was 86.0 ± 2.6 in cows, while this number for Holstein bulls was lower 58.9 ± 1.9 . The length of the ROH segments varied from 1 Mb to over 16 Mb, with the largest number of ROH having a length of 1–2 Mb. Of the 29 chromosomes, BTA 14, BTA 16, and BTA 7 were the most covered by ROH. The mean coefficient of inbreeding across the herds was 0.111 ± 0.003 and 0.104 ± 0.004 based on consecutive and sliding runs, respectively, and 0.078 ± 0.005 for bulls based on consecutive runs. These values do not exceed those for Holstein cattle in North America. The results of this study confirmed the more accurate identification of ROH by consecutive runs, and also that the number of allowed heterozygous SNPs may have a significant effect on ROH data.
Key words: ROH; SNP; inbreeding; cattle.

For citation: Smaragdo M.G. Identification of homozygosity-rich regions in the Holstein genome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):471-479. DOI 10.18699/VJGB-23-57

Идентификация гомозиготно обогащенных участков в геноме голштинов

M.G. Smaragdo

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных –

филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

✉ mik7252@yandex.ru

Аннотация. В настоящем исследовании 371 корова голштинской породы из шести стад и 26 быков голштинской породы, которые использовались в этих стадах, были генотипированы с помощью чипа Illumina BovineSNP50. Для идентификации гомозиготных последовательностей (ROH) выполнялись последовательные и скользящие сканирования с помощью программ detectRUNS и Plink. Пропущенные SNP генотипы не оказали существенного влияния на данные ROH. Среднее количество ROH, выявленное у коров при последовательных сканированиях, составило 95.4 ± 2.7 , при скользящих сканированиях – 86.0 ± 2.6 , тогда как у быков голштинской породы оно было меньше – 58.9 ± 1.9 . Длина сегментов ROH варьировала от 1 до 16 Мб и более, при этом основное количество ROH имело длину 1–2 Мб. Из 29 хромосом наиболее насыщены ROH оказались BTA 14, BTA 16 и BTA 7. Средний коэффициент инбридинга по стадам составил 0.111 ± 0.003 и 0.104 ± 0.004 на основе последовательных и скользящих сканирований соответственно, а для быков на основе последовательных сканирований – 0.078 ± 0.005 . Эти значения не превышали показатели для голштинского скота в Северной Америке. Результаты исследования подтвердили более точную идентификацию ROH последовательными сканированиями, а также то, что количество разрешенных гетерозиготных SNP в ROH может оказывать существенное влияние на данные ROH.
Ключевые слова: ROH; SNP; инбридинг; крупный рогатый скот.

Introduction

Inbreeding in dairy cattle is an inevitable phenomenon of artificial selection. Traditionally, the inbreeding coefficient is calculated based on ancestry (Meuwissen, Luo, 1992). With the advent of SNPs arrays (Matukumalli et al., 2009), it became possible to investigate autozygosity at a previously unattainable level (Peripolli et al., 2016). In fact, due to the runs of homozygosity (ROH) approach, animal genome analysis for long continuous homozygous stretches is still ongoing. The primary cause of autozygosity in livestock measured by ROH is assumed to be inbreeding (Peripolli et

al., 2016) or consanguineous marriage in humans (Ceballos et al., 2018b). For identifying ROH, software based either on identity by descent (IBD) GERMLINE (Gusev et al., 2009), or on Hidden Markov Model (HMM) Beagle (Browning S., Browning B., 2010) and BCFtools (Narasimhan et al., 2016) has been elaborated. In addition, software based on scanning by SNPs window Plink (Purcell et al., 2007), overlapping sliding window SNP101 (Forutan et al., 2018), or both consecutive and sliding runs detectRUNS (Biscarini et al., 2018), as well the software based on other scripts (Howard et al., 2015; Kim et al., 2015), cgaTON (Zhang L. et al., 2013) have been

provided. The commercial software SNP & Variation Suite (Golden Helix SNP & Variation Suite) is also widely used.

It has been shown that software based on HMM and IBD is inferior to other software mentioned above (Howrigan et al., 2011). The main challenge facing scientists is the lack of consistent criteria among studies regarding a threshold value of each parameter analyzed to determine ROH (Peripolli et al., 2016). The most crucial parameters that are used in any software are the number of heterozygous or missing SNP calls allowed in ROH. There is an inconsistency between thresholds that should be applied in studies. Some authors disallowed any number of heterozygous SNPs in ROH (Ferenčaković et al., 2011; Purfield et al., 2012; Bjelland et al., 2013; Marras et al., 2014), others allowed one, two and more heterozygous SNPs depending on the length of the ROH segments (Ferenčaković et al., 2013; Karimi, 2013; Zavarez et al., 2015; Zhang Q. et al., 2015a; Mastrangelo et al., 2016; Ceballos et al., 2018a; Addo et al., 2019; Zinovieva et al., 2020). Anyway, M. Ferenčaković et al. (2013) suggested that allowing a certain amount of genotype errors in a long ROH could minimize the underestimation of these segments. Although S. Mastrangelo et al. (2016) showed different values of the inbreeding coefficient, if heterozygous genotypes were allowed.

There are relatively few studies assessing which set of these parameters is optimal for detecting ROH, in order to better understand their effect on identified autozygosity. M. Ferenčaković et al. (2013) have shown that SNP array density and genotyping errors introduce patterns of bias in the assessment of autozygosity. These authors observed that allowing heterozygous SNPs in ROH can lead to the merging of adjacent ROH segments which resulted in biased estimates of the ROH number. Based on simulation data, D. Howrigan et al. (2011) recommended disallowing existence of any heterozygous SNPs in ROH. Summarizing, there is currently no consensus on a reasonable number of heterozygous SNPs in ROH to avoid bias in the ROH data.

When planning this study, special attention was paid to assessing the impact of allowed missing SNPs and heterozygous SNPs in ROH runs on the results using commonly applied consecutive and sliding runs. Another goal of the study was to evaluate the distribution of ROH in the chromosomes, and the effect of allowed heterozygous SNPs on inbreeding scores.

The following main objectives of the study were: (i) to assess the number and length of ROH segments in the cows and bulls genome, as well as their proportion in the chromosomes, (ii) to calculate the inbreeding coefficient, (iii) to assess the data bias resulting from an allowance of missing and heterozygous SNPs in ROH, (iv) to use the sliding windows and consecutive runs to obtain ROH data.

Materials and methods

Animal resources and SNPs genotyping. Data and genotypes were obtained from Committee on Agro-Industrial Complex of the Leningrad region. This study analyzed Holstein cows born from 2010 to 2013 in six herds located in the Leningrad region (Russia). More information on breeding our local Holstein cattle can be found in the article (Kudinov et al., 2022).

Animals for genotyping were selected by farmers with regard to the pedigree structure of the herd. The sampled ani-

mals accounted for 8–15 % of the total number of dairy cows in herds. Altogether, 371 cows from six herds and 26 bulls from the Netherlands, North America, Germany and Canada used in these herds were genotyped by BovineSNP50 v. 2.0 array (Illumina, USA). Quality control was carried out by Plink. (i) SNPs calls with a quality score of less than 0.7 were removed. (ii) Only autosomal chromosomes were considered. (iii) 5 % of missed SNPs and 1 % MAF were allowed, which resulted in 48,108 SNPs for cows and 43,441 for bulls. Total genotyping rate was > 0.99.

Identification of ROH. The ROH segments were identified using detectRUNS (Biscarini et al., 2018) implemented in the R environment (<http://www.r-project.org/index.html>), and Plink tool (Purcell et al., 2007). The parameters applied to define ROH by detectRUNS for consecutive runs method were: (i) the minimum number of SNPs required to define segments as ROH, 15 and 20, (ii) the number of missing calls allowed in a ROH segment, 0–4, (iii) the number of heterozygous calls allowed in a ROH segment, 0–2, (iv) the minimum length of ROH segments, 250 Kb, (v) the maximum gap between ROH segments, 1 Mb.

For sliding window method in detectRUNS the parameters and thresholds were: (i) window size 15 and 20 SNPs, (ii) the threshold 0.05, (iii) the minimum number of SNPs required to define segments as ROH, 15 and 20, (iv) the number of missing calls allowed in a ROH segment, 0–4, (v) the number of heterozygous calls allowed in a ROH segment, 0–2, (vi) the minimum length of ROH, 250 Kb, (vii) the maximum gap between ROH segments, 1 Mb, (viii) the minimum allowed density of SNPs, 1 SNP per 1 Mb.

The parameters applied to define ROH by Plink were (i) the sliding window, 20 SNPs, (ii) the proportion of homozygous overlapping windows, 0.05, (iii) the minimum number of SNPs in ROH, 20, (iv) the density was one SNP per 60 Kb, (v) the number of missing SNPs was zero, (vi) the number of heterozygous SNPs was zero.

Inbreeding coefficients (F_{ROH}) were calculated as the sum of the animal's ROH lengths divided by the total length of the autosomes covered by SNPs (2508.706681 Mb).

Results

Impact of missing SNPs on ROH data. Primarily, the effect of missing SNPs allowed in ROH on the data was evaluated by consecutive and sliding runs. No impact on ROH data was found for either method if one to four missing SNP calls were allowed in ROH. Therefore, to further evaluate the ROH results, this value was set to zero.

Effect of heterozygous SNPs on ROH data based on consecutive runs. To evaluate the number of ROH segments in the cow genome, 15 SNPs (Suppl. Material 1)¹ and 20 SNPs (Table 1) consecutive runs were carried out. When ROH segments were not interrupted by heterozygous SNPs, the mean number of ROH was 1.9 times greater at 15 SNPs runs ($p \leq 0.03$). In fact, the average number of ROH across the herds was 182.1 ± 3.4 at 15 SNPs runs compared to 95.4 ± 2.7 at 20 SNPs runs. To avoid overestimation of the autozygous ROH due to short ROH segments, 20 SNPs runs were used further.

¹ Supplementary Materials 1–4 are available in the online version of the paper: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx17.pdf>

Table 1. Estimated mean ROH number (\pm SE) in the herds based on 20 SNPs consecutive runs (detectRUNS)

ROH number	Herd						Mean
	1	2	3	4	5	6	
Zero heterozygous SNPs in ROH							
The mean number of ROH	99.6 \pm 6.5	90.5 \pm 1.0	91.5 \pm 1.4	100.4 \pm 14.7	93.0 \pm 1.3	91.4 \pm 1.5	95.4 \pm 2.7
Maximum	360	112	148	757	111	125	
Minimum	2	66	65	48	75	73	
One heterozygous SNP in ROH							
The mean number of ROH	161.9 \pm 10.2	145.4 \pm 1.3	146.5 \pm 1.6	155.8 \pm 12.1	149.2 \pm 1.5	148.8 \pm 1.6	151.3 \pm 2.7
Maximum	565	179	195	692	175	174	
Minimum	7	117	109	82	125	126	
Two heterozygous SNPs in ROH							
The mean number of ROH	262.2 \pm 13.1	243.1 \pm 1.6	244.7 \pm 1.8	253.7 \pm 7.4	245.5 \pm 1.0	248.2 \pm 1.8	249.6 \pm 2.6
Maximum	761	277	281	564	270	283	
Minimum	21	211	215	145	214	207	

Table 2. Estimated mean ROH number (\pm SE) across the herds based on sliding runs (detectRUNS)

ROH number	Herd						Mean
	1	2	3	4	5	6	
Zero heterozygous SNPs in ROH (20 SNPs sliding runs)							
The mean number of ROH	91 \pm 6	82 \pm 1	83 \pm 1	92 \pm 1	85 \pm 1	83 \pm 1	86.0 \pm 2.6
Maximum	336	194	138	731	106	111	
Minimum	1	62	59	44	67	64	
One heterozygous SNP in ROH (20 SNPs sliding runs)							
The mean number of ROH	1579 \pm 9	142 \pm 1	143 \pm 1	146 \pm 5	147 \pm 1	145 \pm 1	146.7 \pm 1.7
Maximum	513	174	175	335	175	169	
Minimum	5	117	114	82	118	120	
Two heterozygous SNPs in ROH (20 SNPs sliding runs)							
The mean number of ROH	268 \pm 10	255 \pm 1	254 \pm 2	256 \pm 4	255 \pm 2	257 \pm 2	257.5 \pm 1.9
Maximum	631	284	287	294	285	288	
Minimum	21	225	220	109	237	222	
Zero heterozygous SNPs (15 SNPs sliding runs)							
The mean number of ROH	190.7 \pm 11.2	175.5 \pm 1.5	178.2 \pm 1.7	191.6 \pm 16.7	178.6 \pm 1.7	179.8 \pm 2.0	182.1 \pm 3.4
Maximum	635	207	243	934	214	217	
Minimum	12	143	150	105	151	147	

For an adequate understanding of the results, it is necessary to define the term ROH further used. ROH is a contiguous homozygous SNP sequence uninterrupted by heterozygous SNPs, except for the allowed number of heterozygous SNP. Descriptive data statistics are given in Table 1. The mean number of ROH varied across herds. However, the differences between them are insignificant (*t*-test). It should be noted that there is considerable variation in the ROH number among the fourth herd cows. This result was due to a large number of ROH in one cow (757 ROH segment). The exclusion of this cow resulted in the mean ROH of 85.9 \pm 2.1 in the fourth herd. However, this did not lead to significant differences between the herds (*t*-test). The effect of allowed heterozygous SNPs on the number and length of the ROH segments was assessed when their values ranged from 0 to 2. Initially, the average number of ROH increased more than 1.6-fold from 95.4 \pm 2.7 to 151.3 \pm 2.7 when one heterozygous SNP in ROH was al-

lowed (see Table 1). Then the mean increased to 249.6 \pm 2.6 with an increase in the number of allowed heterozygous SNPs in ROH to two. Thus, the allowance of heterozygous SNPs leads to a significant ($p \leq 0.02$) increase in the number of ROH.

The length of the ROH segments has been classified into five categories (1–2 Mb, 2–4, 4–8, 8–16, and >16 Mb). The most abundant in the number of ROH was the 1–2 Mb class (Suppl. Material 2). The largest proportion of the ROH number had the same class, up to two allowed heterozygous SNPs. A particularly noticeable increase in the number of ROH in this class occurred with the use of 15 SNP runs (see Suppl. Material 2). These data indicate the presence in the genome of cows of a large number of short (less than 1 Mb) ROH segments, which are more effectively detected when scanning for 15 SNPs.

ROH identification based on sliding runs. As for 15 SNPs and 20 SNPs, the sliding runs were used (Table 2). Interest-

Table 3. Rank of the cows chromosomes by their ROH coverage

BTA*	14	16	7	26	8	13	1	17	4	20	19	6	22	21	24
Consecutive runs**	1.329	1.292	1.236	1.191	1.187	1.119	1.116	1.054	1.048	1.024	1.020	1.011	0.980	0.961	0.960
Sliding runs	1.388	1.295	1.218	1.170	1.169	1.161	1.086	1.050	1.030	0.980	1.010	0.999	1.011	0.965	0.955
BTA	3	11	10	12	2	5	9	25	29	23	15	18	27	28	
Consecutive runs	0.955	0.923	0.916	0.914	0.914	0.911	0.896	0.876	0.844	0.806	0.789	0.758	0.749	0.676	
Sliding runs	0.963	0.909	0.931	0.918	0.898	0.911	0.902	0.920	0.865	0.851	0.800	0.743	0.774	0.680	

* *Bos taurus* autosome.

** The rank values were ranged from maximum to minimum only for consecutive runs.

ingly, the data for 15 SNPs runs identified by both consecutive and sliding runs were largely the same (see Suppl. Material 1 vs. Table 2 (15 SNPs)), while for 20 SNPs consecutive and 20 SNPs sliding runs, the data differ somewhat, but insignificantly (*t*-test) (see Tables 1 and 2). To obtain a comparable result with consecutive runs, 20 SNPs window was used further. Descriptive statistic for 20 SNPs sliding data is given in Table 2. The mean number of ROH between herds was insignificant (*t*-test). But, similar to consecutive runs after exclusion of the most deviated cow (it included 731 ROH segments) among the fourth herd, the mean number of ROH became 77.6 ± 2.0 . However, this value still did not significantly differ from those for other herds (*t*-test). The average number of ROH increased by 1.7 times, from 86.0 ± 2.6 to 146.7 ± 1.7 , when one heterozygous SNP was allowed in ROH, then by 3 times when two heterozygous SNPs were allowed. The observed increase in the number of ROH was significant $p \leq 0.02$ (*t*-test).

The length of the ROH segments for sliding runs has been classified into the same five categories (1–2, 2–4, 4–8, 8–16, and >16 Mb) as it has been carried out for consecutive runs (Suppl. Material 3). The most numerous in the number of ROH has occurred in the same class of 1–2 Mb, in which a considerable increase in ROH segments was observed with an increase in the number of allowed heterozygous SNPs in ROH. This indicates the proximity of numerous ROH segments shorter than 1 Mb in the cow genome.

ROH identification based on Plink. Plink software is widely used in ROH studies. Therefore, it is necessary to compare the data obtained by Plink and detectRUNS. The mean number of ROH obtained with Plink was 74.9 ± 1.9 and this value was no different from the value calculated by detectRUNS based on sliding runs 86.0 ± 2.6 (*t*-test). The fact that Plink identified fewer ROH segments mainly in the 1–2 Mb class than detectRUNS detected (see Suppl. Materials 2 and 3) indicates Plink's lesser ability to identify short segments less than 1 Mb. Thus, the data obtained for the shortest ROH length class can be highly dependent on the software and parameters used.

Comparative analysis of consecutive and sliding runs. Comparative analysis of the consecutive and sliding data led to the following conclusions. When heterozygous SNPs were disallowed, the consecutive runs showed a slightly bigger mean number of ROH than sliding runs (94.4 ± 2.7 vs. 86.0 ± 2.6) and even bigger for sliding windows (Plink)

74.9 ± 1.9 , but the difference between them was insignificant (*t*-test). The fewer SNPs were used in consecutive runs, the more 1–2 Mb ROH segments there were (Table 3). Summarizing the comparative analysis of the applied methods, one can come to the conclusion that there are some differences in the results obtained by these methods.

Distribution of ROH in the cow chromosomes. To evaluate the chromosomes with the largest number of ROH segments taking into account their length, the following calculation was carried out. For each chromosome, the proportion of ROH in it was divided by the share of its size in the cattle genome. The rank chromosome calculation is shown in Suppl. Material 4. For both runs, the list of chromosomes ranked in this way is shown in Table 3. Out of 29 chromosomes, the top chromosomes covered with ROH were BTA 14, BTA 16 and BTA 7, not BTA 1 (seventh position in the list), BTA 2 (20th position in the list) and BTA 3 (16th position in the list). Thus, the number of ROH in the chromosomes was not proportional to their length. Spearman's correlation between consecutive and sliding runs data in Table 3 was $r = 1.0$ ($p \leq 2.0E-07$). Whether this fact is a result of drift or/and selection requires further study.

Inbreeding. To assess the level of inbreeding in the herds, the mean inbreeding coefficient was calculated across all herds (Tables 4 and 5). When heterozygous SNPs were disallowed, the mean inbreeding coefficients across the herds amounted to 0.111 ± 0.003 and 0.104 ± 0.004 for consecutive and sliding runs, respectively, and the difference between them was insignificant (*t*-test). The mean inbreeding coefficient estimated by Plink was 0.105 ± 0.004 , which is consistent with those for sliding runs. A greater variability in inbreeding occurred for the fourth herd. This result is mainly associated with a highly inbred cow in this herd. Exclusion of this cow results in the average inbreeding coefficient of 0.096 ± 0.005 and 0.089 ± 0.005 for consecutive and sliding runs. It should be noted that in this herd the cows were inseminated only from the Netherlands bulls, while in other herds the bulls' semen from North America, Germany, Canada, and the Netherlands was used. The proportion of the bulls from these countries used in the herds was published in the article (Smaragdov et al., 2018). After excluding the highly inbred cow, the average inbreeding coefficient in the fourth herd decreased compared to other herds. This result indicates the correct selection of the bulls even if their semen was imported from the same country. The fourth herd deviated significantly from the other herds

Table 4. Estimated average inbreeding coefficient (\pm SE) in the herds based on 20 SNPs consecutive runs (detectRUNS)

Parameter	Herd						Mean
	1	2	3	4	5	6	
Zero heterozygous SNPs in ROH							
Inbreeding coefficient	0.117 \pm 0.004	0.112 \pm 0.002	0.105 \pm 0.002	0.111 \pm 0.016	0.116 \pm 0.003	0.105 \pm 0.003	0.111 \pm 0.003
Maximum	0.227	0.153	0.160	0.779	0.166	0.158	
Minimum	0.0006	0.060	0.068	0.047	0.075	0.071	
One heterozygous SNP in ROH							
Inbreeding coefficient	0.153 \pm 0.006	0.143 \pm 0.002	0.143 \pm 0.002	0.147 \pm 0.018	0.147 \pm 0.002	0.137 \pm 0.003	0.145 \pm 0.003
Maximum	0.367	0.184	0.184	0.908	0.191	0.192	
Minimum	0.003	0.091	0.091	0.072	0.104	0.102	
Two heterozygous SNPs in ROH							
Inbreeding coefficient	0.208 \pm 0.008	0.195 \pm 0.002	0.189 \pm 0.002	0.198 \pm 0.017	0.199 \pm 0.002	0.190 \pm 0.003	0.196 \pm 0.003
Maximum	0.511	0.235	0.229	0.948	0.240	0.246	
Minimum	0.010	0.139	0.148	0.102	0.158	0.155	

Table 5. Estimated average inbreeding coefficient (\pm SE) in herds based on 20 SNPs sliding runs (detectRUNS)

Parameter	Herd						Mean
	1	2	3	4	5	6	
Zero heterozygous SNPs in ROH							
Inbreeding coefficient	0.110 \pm 0.004	0.105 \pm 0.002	0.098 \pm 0.002	0.103 \pm 0.015	0.109 \pm 0.003	0.098 \pm 0.003	0.104 \pm 0.004
Maximum	0.204	0.146	0.153	0.739	0.158	0.151	
Minimum	0.0003	0.055	0.063	0.040	0.070	0.065	
One heterozygous SNP in ROH							
Inbreeding coefficient	0.154 \pm 0.007	0.143 \pm 0.002	0.137 \pm 0.002	0.146 \pm 0.018	0.148 \pm 0.002	0.138 \pm 0.003	0.148 \pm 0.003
Maximum	0.392	0.186	0.184	0.938	0.254	0.194	
Minimum	0.002	0.092	0.094	0.070	0.173	0.104	
Two heterozygous SNPs in ROH							
Inbreeding coefficient	0.227 \pm 0.010	0.213 \pm 0.002	0.207 \pm 0.002	0.217 \pm 0.018	0.217 \pm 0.002	0.208 \pm 0.003	0.215 \pm 0.015
Maximum	0.583	0.254	0.244	0.980	0.254	0.257	
Minimum	0.010	0.157	0.167	0.108	0.173	0.173	

when variability was measured by the Wright’s fixation index or PCA (Smarađov, Kudinov, 2020). When one heterozygous SNP was allowed in ROH, then the mean inbreeding coefficient across all herds was 0.145 \pm 0.003 and 0.148 \pm 0.003 based on consecutive and sliding runs. Thus, the allowance of even one heterozygous SNP resulted in an increase in the inbreeding coefficient ($p \leq 0.06$). Therefore, to assess inbreeding in the herds, heterozygous SNPs should be disallowed in ROH due to sizable bias.

Confirmation of results obtained on cows with data on bulls. To validate the results obtained on the cows, the bulls that have been used two generations ago in the same herds were analyzed for ROH. The mean number of the ROH segments for the bulls, 58.9 \pm 1.9, turned out to be significantly less than for the cows, 95.4 \pm 2.7 ($p \leq 0.05$) (Tables 1 and 6). The mean inbreeding coefficient for the bulls was 0.078 \pm 0.005 and did not differ significantly from the cows (t -test). The coefficient of inbreeding did not significantly increase when one heterozygous SNP was allowed (t -test) (Table 7).

Table 6. Estimated mean ROH number (\pm SE) on bulls based on 20 SNPs consecutive runs (detectRUNS)

ROH number	N*		
	0	1	2
The mean number of ROH	58.9 \pm 1.9	93.6 \pm 1.7	153.5 \pm 1.8
Maximum	85	112	172
Minimum	44	79	128

* The number of allowed heterozygous SNPs in ROH.

Table 7. Estimated inbreeding coefficient (\pm SE) on bulls based on 20 SNPs consecutive runs (detectRUNS)

N*	Inbreeding coefficient		
	0	1	2
Inbreeding coefficient	0.078 \pm 0.005	0.098 \pm 0.005	0.133 \pm 0.004

* The number of allowed heterozygous SNPs in ROH.

Discussion

Over the past decade, the runs of homozygosity approach has been widely used both in humans (Ceballos et al., 2018b) and farm animals (Peripolli et al., 2016). A distinctive feature of ROH studies is the variety of software and threshold criteria used in them. The most widely applied software tools for identifying ROH segments are either sliding window or consecutive runs. We preferred detectRUNS, where both approaches have been implemented (Biscarini et al., 2018).

The consecutive runs resulted in the average number of ROH 94.4 ± 2.7 , while sliding runs, 86.0 ± 2.6 . These values for North American (Forutan et al., 2018), Italian (Marras et al., 2014), European Holstein (Zinovieva et al., 2020), and Polish Holstein Black-and-White variety (Szmatoła et al., 2019) are 82.3 ± 9.8 (SD), 81.7 ± 9.7 (SD), 74.6 ± 2.3 (SE), and 53.3 ± 7.3 (SD) respectively. The first three values do not differ significantly from ours, while the value for Polish cattle differs considerably. It should be noted that the allowance of even one heterozygous SNP in ROH significantly increases the number of ROH by 55.9 and 60.7 points for consecutive and sliding runs, respectively (see Tables 1 and 2). A limited number of studies have analyzed the effect of allowed heterozygous SNPs on ROH data. D. Howrigan et al. (2011) recommended disallowing the use of any heterozygous SNPs in ROH, while M. Ferencaković et al. (2013) suggested that the number of allowed heterozygous SNPs should be determined separately for each ROH length of interest and for each SNPs density. Moreover, the allowance of heterozygous SNPs in ROH leads to a sizable bias in the inbreeding coefficient (Mastrangelo et al., 2016). My results confirm this conclusion.

The relative frequency of the ROH number in different length classes obtained from the cows data for consecutive runs were 61.4 % (1–2 Mb), 19.8 % (2–4 Mb), 11.3 % (4–8 Mb), 5.5 % (8–16 Mb) and 1.9 % (longer than 16 Mb), while for sliding runs these values were 60, 19.8, 12.1, 5.8, and 2.1 %. Thus, the largest number of ROH was identified in the shortest 1–2 Mb class. Plink-running of the cows genome revealed the following ROH frequencies in five categories 52 % (1–2 Mb), 25 % (2–4 Mb), 14 % (4–8 Mb), 7 % (8–16 Mb) and 2.5 % (longer than 16 Mb), the distribution of which is slightly different from those defined by detectRUNS. For North American Holstein animals, these values were 43.5, 23.9, 17.7, 10.5, and 4.7 % (Forutan et al., 2018). The corresponding values for Italian Holstein bulls were 56.9, 20.8, 11.9, 7.2, and 3.7 % (Marras et al., 2014) and Polish Holstein, 23, 19, 9.8, 4.4, and 1.3 % (Szmatoła et al., 2019). Thus, when we used detectRUNS to scan the genome of our local Holstein cows, we obtained an abundant number of short ROH as a result of haplotypes reflecting the ancient relationship within breeding animals. But, when we used Plink, the values were similar to the American and Italian data. It should be noted that the authors of the article (Szmatoła et al., 2019) used the cgaTOH software and their data differ considerably from other data. Whether this result was due to the cgaTOH software (minimal number of 30 consecutive homozygous SNPs in ROH) or/and selection requires further analysis. Estimation of the true number of short ROH is important, since 0.1–3 Mb ROH segments have the more number of deleterious variants than segments longer than 3 Mb (Zhang Q. et al., 2015b). For evaluation of the genomic estimated breeding value (GEBV),

short ROH is essential for genomic construction of ROH-based relationship matrix (G_{ROH}) (Luan et al., 2014).

According to my data, the largest number of ROH falls into the 1–2 Mb class. As the number of allowed heterozygous SNPs in ROH increases, the number of ROH segments in the shortest 1–2 Mb class increases as well (see Suppl. Materials 2 and 3). This fact indicates a close location of a large number of short, less than 1 Mb, ROH segments.

The same conclusion was reached in a study of ten sequenced (WGS) breeds of cattle (Mulim et al., 2022). Then, the results of the animals ROH genome scanning can substantially depend not only on the selection but also on the genotyping method and the software used to identify short ROH segments. This fact should be taken into account in the comparative analysis of the ROH data.

Estimated by detectRUNS, the mean inbreeding coefficient for six herds was 0.111 ± 0.003 and 0.104 ± 0.004 for consecutive and sliding runs, respectively, and for bulls, 0.078 ± 0.005 for consecutive runs. It was equal to 0.105 ± 0.004 based on the sliding window runs evaluated by Plink. It should be noted that cows from six herds did not differ in the mean inbreeding coefficient (see Tables 4 and 5), while according to Principal Components Analysis, the fourth herd differed significantly from all other herds (Smaragdov, Kudinov, 2020). Therefore, this difference is not due to inbreeding.

The accurate knowledge of inbreeding in the herds that occurred several decades in the past is necessary both for calculating the inbreeding trend and for evaluating selection strategies. To solve this problem, high-density arrays or whole genome sequencing (WGS) should be used. Comparison of 50k and HD panels provides evidence that the data from the 50k panel lead to imprecise determination of short ROH segments (Ferencaković et al., 2013). However, it has been shown that ROH detection based on high-density or 50k array data might give the estimates of current inbreeding most similar to ROH values obtained from the sequence data (Zhang Q. et al., 2015a). M. Bhati et al. (2020) provided comprehensive WGS data for Braunvich cattle. Medium-sized ROH (0.1–2 Mb) were the most frequent class (50.46 %) and made the largest contribution (75 %) to total genomic inbreeding, while short, 50–100 Kb, ROH occurred almost as frequently (49.17 %) as medium-sized ROH, they contributed only 19.52 % to total genomic inbreeding. These findings provide an accurate estimate of short ROH in the cattle genome and their contribution to total inbreeding. The average F_{ROH} estimated from the WGS data was 0.14 in Braunvich cattle. This value is less than WGS F_{ROH} in Holstein, 0.18 (Bhati et al., 2020). Summarizing, the 50k panel cannot accurately capture ancient inbreeding that occurred a few decades in the past. The inbreeding coefficient of American Holstein measured with ROH in 2011 was 0.12 and after applying genomic selection, it increased to 0.15 in 2018 (Forutan et al., 2018). For European (Zinovieva et al., 2020), Italian (Marras et al., 2014), and Polish Holstein (Szmatoła et al., 2019), these values were 0.108 ± 0.006 (SE), 0.116 ± 0.001 (SE), and 0.118 ± 0.027 (SD), respectively. It is important to note that in the above studies, ROH data were based on the 50k array; thereby, ROH segments not shorter than 1 Mb were identified. Once again, we have to admit that, according to our data, an increase in the number of mostly short ROHs (1–2 Mb) by 395 points identified during consecu-

tive runs compared to sliding runs (Suppl. Materials 2 and 3) leads to only a slight increase in the inbreeding coefficient (Tables 4 and 5).

It can be assumed that there should be an event horizon for a herd or population, beyond which it is impossible to obtain valid information about inbreeding events in history of their breeding. I hypothesize that in our local population, a reduced effective population size, ongoing admixture and inbreeding throughout its history, accompanied by recombination, should lead to the largest number of short ROH less than 1 Mb in the herds currently studied. These short ROH can be considered as ancient ROH segments formed by some population events, such as drift, bottleneck, and inbreeding that occurred many decades ago. The bottleneck in our local herds has not previously been proven by Principal Component Analysis (Smaragdov, Kudinov, 2020). An accurate interpretation of these short ROH can be troublesome without knowledge of the herd management history. In addition, it is very important to know the true number of short ROHs in the analyzed animals resulting from inbreeding (see above-mentioned WGS data). Thus, the event horizon can depend on both pedigree information, ROH length profile (SNPs array or WGS used) as well as on the algorithm-defined approach to ROH identification. However, ROH segments shorter than 500 Kb can be considered to be beyond the event horizon due to strong LD and inconsistency with autozygosity. The short ROH characterized by strong LD among markers are not always considered autozygous, but nevertheless they may have formed due to mating with distantly related animals (McKay et al., 2007). Summarizing, it should be assumed that inbreeding data can be only relatively correct based on ROH larger than 1 Mb (no more than 50 generation back).

A number of studies have noted an uneven distribution of ROH in the bovine genome, e. g. (Ferencakovic et al., 2011; Sölkner et al., 2014; Howard et al., 2015). Giving the number of ROH in the chromosomes, we calculated their rank taking into account the proportion of chromosome length in the genome of the cattle (see Table 3). Out of 29 chromosomes, the most covered with ROH segments were BTA 14, BTA 16 and BTA 7 for both approaches used. D. Purfield et al. (2012) noticed that among the breeds studied, BTA 14 and BTA 16 had the highest degree of ROH segments overlap. The regions of the genome with the highest frequency of occurrence of ROH in the genome of the studied animals were called “ROH islands” (Nothnagel et al., 2010; Pemberton et al., 2012). The ROH islands on BTA 14 and BTA 16 were identified among Polish Holstein-Friesian animals (Szmatoła et al., 2019). In Holstein cows in our study, ROH islands were localized in BTA 7 and BTA 14 (unpublished results). In American Holstein, ROH distribution was more variable among the genomes of the selected animals, compared to a relatively even ROH distribution in unselected animals (Kim et al., 2013). Regions with a high proportion of ROH for American and New Zealand Jersey cows and bulls were revealed on BTA 3 and BTA 7 (Howard et al., 2015). On BTA 14 and BTA 16, one strongest ROH region was found common for Kholmogor and Holstein breeds and one region common for Yaroslavl and Holstein breeds (Zinovieva et al., 2020). Extremely non-uniform ROH patterns among bovine populations of Angus, Brown Swiss, and Fleckvieh breeds were mainly

located on BTA 6, BTA 7, BTA 16, and BTA 21 (Sölkner et al., 2014). The highest number of ROH islands among all Neileore breed lineages was found on BTA 7 (Peripolli et al., 2018a). In addition, an enrichment of genes affecting traits of interest for dairy breeds was shown on BTA 14 in dairy Gyr breed (*Bos indicus*) (Peripolli et al., 2018b). D. Goszczynski et al. (2018) analyzed ROH >16 Mb (three generations from a common ancestor) in highly inbred Retinta bulls. Among other chromosomes, the highest occurrence of ROH was found on BTA 7. Summarizing the above studies, it can be suggested that BTA 7 is outstanding regarding ROH islands occurrence in the cattle genome but in general there is no overall direct relationship between the proportion of ROH segments in the chromosomes and ROH islands identified there.

As discussed above, the number of identified short ROH is highly dependent on the software used and also on the genotyping method. Moreover, it can be suggested that consecutive runs more accurately identified the ROH pattern in the cow genome. However, both methods coincide in assessing the distribution of ROH segments on chromosomes (see Table 3). Taking the findings together, it should be assumed that uneven distribution of ROH segments in the cow genome is a result of different inbreeding events that have occurred in their history.

Conclusion

Analysis of ROH data showed that consecutive runs most accurately identified ROH in the cattle genome. It has been shown that missing SNPs did not have a noticeable effect on the number of ROH, while an allowance of even one heterozygous SNP in the ROH segments had a significant effect. Therefore, care should be taken to allow any heterozygous SNPs in the ROH. The average number of ROH across herds was 95.4 ± 2.7 and their length varied from 1 Mb to more than 16 Mb. The class with the length of 1–2 Mb was the most numerous in the number of ROH. This confirms the long history of inbreeding in herds for many decades in the past. Moreover, the number of ROH in the chromosomes does not depend on their length. ROH segments mainly cover BTA 14, BTA 16, and BTA 7. The average inbreeding coefficient for our local Holstein herds was 0.111 ± 0.003 , which is not much different from the Holstein cattle inbreeding coefficient worldwide. This value indicates competent management of the studied herds. In addition, the inbreeding coefficient obtained on cows is consistent with the inbreeding coefficient of 0.078 ± 0.005 calculated in our study for Holstein bulls from other countries. These bulls have been used in breeding our local Holstein cattle two generations ago.

References

- Addo S., Klingel S., Hinrichs D., Thaller G. Runs of homozygosity and NetView analyses provide new insight into the genome-wide diversity and admixture of three German cattle breeds. *PLoS One*. 2019;14(12):e0225847. DOI 10.1371/journal.pone.0225847.
- Bhati M., Kadri N., Crysanto D., Pausch H. Assessing genomic diversity and signatures of selection in Original Braunvieh cattle using whole-genome sequencing data. *BMC Genomics*. 2020;21(1):27. DOI 10.1186/s12864-020-6446-y.
- Biscarini F., Cozzi P., Gaspa G., Marras G. detectRUNS: detect runs of homozygosity and runs of heterozygosity in diploid genomes. R package version 0.9.5. 2018.

- Bjelland D., Weigel K., Vukasinovic N., Nkrumah J. Evaluation of inbreeding depression in Holstein cattle using whole-genome SNP markers and alternative measures of genomic inbreeding. *J. Dairy Sci.* 2013;96(7):4697-4706. DOI 10.3168/jds.2012-6435.
- Browning S., Browning B. High-resolution detection of identity by descent in unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;86(4):526-539. DOI 10.1016/j.ajhg.2010.02.021.
- Ceballos F., Hazelhurst S., Ramsay M. Assessing runs of Homozygosity: a comparison of SNP array and whole genome sequence low coverage data. *BMC Genomics.* 2018a;19(1):106. DOI 10.1186/s12864-018-4489-0.
- Ceballos F., Joshi P., Clark D., Ramsay M., Wilson J. Runs of homozygosity: windows into population history and trait architecture. *Nat. Rev. Genet.* 2018b;19(4):220-234. DOI 10.1038/nrg.2017.109.
- Ferenčaković M., Hamzic E., Gredler B., Curik I., Johann S. Runs of homozygosity reveal genome-wide autozygosity in the Austrian Fleckvieh cattle. *Agric. Conspec. Sci.* 2011;76(4):325-329.
- Ferenčaković M., Sölkner J., Curik I. Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors. *Genet. Sel. Evol.* 2013;45:42.
- Forutan M., Mahyari S., Baes C., Melzer N., Schenkel F., Sargolzaei M. Inbreeding and runs of homozygosity before and after genomic selection in North American Holstein cattle. *BMC Genomics.* 2018;19(1):98. DOI 10.1186/s12864-018-4453-z.
- Goszczyński D., Molina A., Tera E., Morales-Durand H., Ross P., Cheng H., Giovambattista G., Demyda-Peyrás S. Runs of homozygosity in a selected cattle population with extremely inbred bulls: descriptive and functional analyses revealed highly variable patterns. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200069. DOI 10.1371/journal.pone.0200069.
- Gusev A., Lowe J., Stoffel M., Daly M., Altshuler D., Breslow J., Friedman J., Peer I. Whole population, genome-wide mapping of hidden relatedness. *Genome Res.* 2009;19(2):18-26. DOI 10.1101/gr.081398.108.
- Howard J., Maltecca C., Haile-Mariam M., Hayes B., Pryce J. Characterizing homozygosity across United States, New Zealand and Australian Jersey cow and bull populations. *BMC Genomics.* 2015;16(1):187. DOI 10.1186/s12864-015-1352-4.
- Howrigan D., Simonson M., Keller M. Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genomics.* 2011;12:460. DOI 10.1186/1471-2164-12-460.
- Karimi Z. Runs of homozygosity patterns in taurine and indicine cattle breeds. Doctoral thesis. Vienna: Univ. of Natural Resources and Life Sciences, 2013.
- Kim E., Cole J., Huson H., Wiggans G., Van Tassel C., Crooker B., Liu G., Da Y., Sonstegard T. Effect of artificial selection on runs of homozygosity in U.S. Holstein cattle. *PLoS One.* 2013;8(11):e80813. DOI 10.1371/journal.pone.0080813.
- Kim E., Sonstegard T., Van Tassel C., Wiggans G., Rothschild M. The relationship between runs of homozygosity and inbreeding in Jersey cattle under selection. *PLoS One.* 2015;10(7):e0129967. DOI 10.1371/journal.pone.0129967.
- Kudinov A., Mäntysaari E., Pitkänen T., Saksa E., Aamand G., Uimari P., Strandén I. Single-step genomic evaluation of Russian dairy cattle using internal and external information. *J. Anim. Breed. Genet.* 2022;139(3):259-270. DOI 10.1111/jbg.12660.
- Luan T., Yu X., Dolezal M., Bagnato A., Meuwissen T.H. Genomic prediction based on runs of homozygosity. *Genet. Sel. Evol.* 2014;46(1):64. DOI 10.1186/s12711-014-0064-6.
- Marras G., Gaspa G., Sorbolini S., Dimauro C., Ajmone-Marsan P., Valentini A., Williams J., Macciotta N. Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy. *Anim. Genet.* 2014;46(2):110-121. DOI 10.1111/age.12259.
- Mastrangelo S., Tolone M., Di Gerlando R., Fontanesi L., Sardina M., Portolano B. Genomic inbreeding estimation in small populations: evaluation of runs of homozygosity in three local dairy cattle breeds. *Animal.* 2016;10(5):746-754. DOI 10.1017/S1751731115002943.
- Matukumalli L., Cynthia T., Lawley C., Robert D., Schnabel R., Taylor J., Allan M., Heaton M., O'Connell J., Moore S., Smith T., Sonstegard T., Van Tassel C. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One.* 2009;4(4):e5350. DOI 10.1371/journal.pone.0005350.
- McKay S.D., Schnabel R.D., Murdoch B.M., Matukumalli L.K., Aerts J., Coppieters W., Crews D., Dias Neto E., Gill C.A., Gao C., Mannen H., Stothard P., Wang Z., Van Tassel C.P., Williams J.L., Taylor J.F., Moore S.S. Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. *BMC Genetics.* 2007;8:74. DOI 10.1186/1471-2156-8-74.
- Meuwissen T., Luo Z. Computing inbreeding coefficient in large populations. *Genet. Sel. Evol.* 1992;24(4):305-313. DOI 10.1186/1297-9686-24-4-305.
- Mulim H., Brito L., Pinto L., Ferraz J., Grigoletto L., Silva M., Pedrosa V. Characterization of runs of homozygosity – enriched regions, and population structure in cattle populations selected for different breeding goals. *BMC Genomics.* 2022;23(1):209. DOI 10.1186/s12864-022-08384-0.
- Narasimhan V., Danecsek P., Scally A., Xue Y., Tyler-Smith C., Durbin R. BCFTools/ROH: a hidden Markov model approach for detecting autozygosity from next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2016;32(11):1749-1751. DOI 10.1093/bioinformatics/btw044.
- Nothnagel M., Lu T., Kayser M., Krawczak M. Genomic and geographic distribution of SNP-defined runs of homozygosity in Europeans. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(15):2927-2935. DOI 10.1093/hmg/ddq198.
- Pemberton T., Absher D., Feldman M., Myers R., Rosenberg N., Li J. Genomic: patterns of homozygosity in worldwide human populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;91(2):275-292. DOI 10.1016/j.ajhg.2012.06.014.
- Peripolli E., Munari D., Silva M., Lima A., Irgang R., Baldi F. Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock. *Anim. Genet.* 2016;48(3):255-271. DOI 10.1111/age.12526.
- Peripolli E., Metzger J., de Lemos M.V.A., Stafuzza N.B., Kluska S., Olivieri B.F., Feitosa F.L.B., Berton M.P., Lopes F.B., Munari D.P., Lôbo R.B., Magnabosco C.U., Di Croce F., Osterstock J., Denise S., Pereira A.S.C., Baldi F. Autozygosity islands and ROH patterns in Nellore lineages: evidence of selection for functionally important traits. *BMC Genomics.* 2018a;19(1):680. DOI 10.1186/s12864-018-5060-8.
- Peripolli E., Stafuzza N.B., Munari D.P., Lima A.L.F., Irgang R., Machado M.A., Panetto J.C.D.C., Ventura R.V., Baldi F., da Silva M.V.G.B. Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle. *BMC Genomics.* 2018b;19(1):34. DOI 10.1186/s12864-017-4365-3.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(3):559-575. DOI 10.1086/519795.
- Purfield D., Berry D., McParland S., Bradley D. Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC Genetics.* 2012;13:70. DOI 10.1186/1471-2156-13-70.
- Smaragdov M., Kudinov A. Assessing the power of principal components and wright's fixation index analyzes applied to reveal the genomewide genetic differences between herds of Holstein cows. *BMC Genetics.* 2020;21:47. DOI 10.1186/s12863-020-00848-0.
- Smaragdov M., Kudinov A., Uimari P. Assessing the genetic differentiation of Holstein cattle herds in the Leningrad region using F_{st} statistics. *Agric. Food Sci.* 2018;27(2):96-101. DOI 10.23986/afsci.69777.
- Sölkner J., Ferenčaković M., Karimi Z., Pérez O'Brien A.M., Mészáros G., Eaglen S., Boison S., Curik I. Extremely non-uniform: patterns of runs of homozygosity in bovine populations. In: Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (August 17–22, 2014, Vancouver, BC Canada). 2014.

- Szmatola T., Gurgul A., Jasielczuk I., Zabek T., Ropka-Molik K., Litwinczuk Z., Bugno-Poniewierska M. Comprehensive analysis of runs of homozygosity of eleven cattle breeds representing different production types. *Animals*. 2019;9(12):1024. DOI 10.3390/ani9121024.
- Zavarez L.B., Utsunomiya Y.T., Carmo A.S., Neves H.H., Carvalheiro R., Ferenčaković M., Pérez O'Brien A.M., Curik I., Cole J.B., Van Tassell C.P., da Silva M.V., Sonstegard T.S., Sölkner J., Garcia J.F. Assessment of autozygosity in Nellore cows (*Bos indicus*) through high density SNP genotypes. *Front. Genet.* 2015;6:5. DOI 10.3389/fgene.2015.00005.
- Zhang L., Orloff M., Reber S., Li S., Zhao Y., Eng C. cgaTOH: extended approach for identifying tracts of homozygosity. *PLoS One*. 2013;8:e57772. DOI 10.1371/journal.pone.0057772.
- Zhang Q., Calus M., Gulbrandsen B., Lund M., Sahana G. Estimation of inbreeding using pedigree, 50k SNP chip genotypes and full sequence data in three cattle breeds. *BMC Genetics*. 2015a;16:88. DOI 10.1186/s12863-015-0227-7.
- Zhang Q., Gulbrandsen B., Bosse M., Lund M., Sahana G. Runs of homozygosity and distribution of functional variants in the cattle genome. *BMC Genomics*. 2015b;16:542. DOI 10.1186/s12864-015-1715-x.
- Zinovieva N., Dotsev A., Sermyagin A., Deniskova T., Abdelmanova A., Kharzinova V., Solkner J., Reyer H., Wimmers K., Brem G. Selection signatures in two oldest Russian native cattle breeds revealed using high density single nucleotide polymorphism analysis. *PLoS One*. 2020;15:e0242200. DOI 10.1371/journal.pone.0242200.

ORCID IDSmaragdov M.G. orcid.org/0000-0002-5087-6444**Acknowledgements.** This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment Program No. 121052600352-3).**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Received December 4, 2022. Revised February 3, 2023. Accepted February 27, 2023.

CD-1 mice females recognize male reproductive success via volatile organic compounds in urine

A.S. Khotskina¹✉, E.L. Zavjalov¹, E.P. Shnayder¹, L.A. Gerlinskaya¹, S.O. Maslennikova¹, D.V. Petrovskii¹, M.N. Baldin², A.L. Makas², V.M. Gruznov², M.L. Troshkov², M.P. Moshkin¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Trofimuk Institute of Petroleum Geology and Geophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ dotcenko@bionet.nsc.ru

Abstract. Sexual selection is considered as one of the leading factors of evolutionary development. In the conditions of incessant competition, specialized methods of attracting individuals of the opposite sex as well as criteria for assessing the quality of a sexual partner have been formed. In order for animals to rely on signaling from sexual partners, the signal must reflect the morpho-physiological status of animals. A high reproductive efficiency of male mice is a good advantage for mate selection and thus must be somehow demonstrated to potential mates. The aim of our study was to find out if male mice could demonstrate their reproductive efficiency through urine volatile organic compounds. The experiment implies cohabiting one male with two mature females for 6 days. The reproductive success of the male was assessed by the presence or absence of pregnant females. At the same time, naive females, who did not participate in reproduction, assessed the urine of the successful males as more attractive, which was expressed in shorter Latency time of sniffs in the Olfactory test. Using a rapid headspace GC/MS analysis, we have found volatile organic compounds (VOCs) in male urine that correlated with female behavior. It turned out that these substances are derivatives of mouse pheromone 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone. The amplitude of peaks corresponding to this pheromone correlated with the testosterone level in blood and the weight of preputial glands. The amplitude of peaks increased in males after mating with whom the females turned out to be pregnant. It is important to note that body weight, weight of testes, weight of seminal vesicles, weight of preputial glands, and plasma testosterone level alone are not reliable indicators of male reproductive success. Thus, the content of the pheromone 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone in the urine of males can serve as a good predictor of the quality of the male as a sexual partner for female CD-1 mice.

Key words: chemical signals; dihydrofuran; GC/MS; 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone; mating preference; olfactory preference; reproductive success.

For citation: Khotskina A.S., Zavjalov E.L., Shnayder E.P., Gerlinskaya L.A., Maslennikova S.O., Petrovskii D.V., Baldin M.N., Makas A.L., Gruznov V.M., Troshkov M.L., Moshkin M.P. CD-1 mice females recognize male reproductive success via volatile organic compounds in urine. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):480-487. DOI 10.18699/VJGB-23-58

Самки мышей CD-1 распознают репродуктивно успешных самцов по летучим органическим соединениям их мочи

A.C. Хоцкина¹✉, Е.Л. Завьялов¹, Е.П. Шнайдер¹, Л.А. Герлинская¹, С.О. Масленникова¹, Д.В. Петровский¹, М.Н. Балдин², А.Л. Макасы², В.М. Грузнов², М.Л. Трошков², М.П. Мошкин¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ dotcenko@bionet.nsc.ru

Аннотация. Половой отбор рассматривается в качестве одного из ведущих факторов эволюционного развития. В условиях постоянной конкуренции сформировались специализированные способы привлечения особей противоположного пола, а также критерии оценки качества полового партнера. Самцы, способные оставить наибольшее количество потомков, должны быть более привлекательными половыми партнерами, что требует от них каким-либо образом демонстрировать самкам свои преимущества. При этом ключевое условие для реализации такого отбора – это способность сигнала достоверно отражать информацию о физиологическом состоянии организма особи. У мышей одним из ведущих каналов передачи информации являются хемосигналы. Целью нашего исследования было выяснить, могут ли самцы мышей демонстрировать самкам свою репродуктивную эффективность через летучие органические соединения мочи. В ходе эксперимента самцу подсаживали двух половозрелых самок на шесть дней для размножения. Репродуктивный успех самца оценивали по наличию или отсутствию потомства. В то же время половозрелые самки, ранее не участвовавшие в размножении, оценивали мочу этих самцов. Оказалось, что более привлекательной была моча самцов, способных оставить потомство. Это выражалось в более коротком латентном времени обнюхивания самкой мочи самца в ольфак-

торном тесте. При помощи газовой хроматографии в моче самцов были обнаружены летучие органические соединения, которые коррелировали с поведением самок. Масс-спектрометрический анализ образцов мочи показал, что эти соединения являются производными феромона мышей 6-гидрокси-6-метил-3-гептанона. Амплитуда пиков, соответствующих данному феромону, коррелировала с уровнем тестостерона в крови и массой препуциальных желез и была выше у самцов с фертильными покрытиями. Важно отметить, что ключевые морфофизиологические показатели, такие как масса тела, масса семенников, препуциальных желез, семенных пузырьков, а также уровень тестостерона в плазме крови самцов, не отражали их способность оставить потомство. Таким образом, содержание феромона 6-гидрокси-6-метил-3-гептанона в моче самцов CD-1 может служить хорошим критерием их репродуктивной эффективности.

Ключевые слова: хемосигналы; дигидрофуран; ГХ/МС; 6-гидрокси-6-метил-3-гептанон; половое предпочтение; ольфакторное предпочтение; репродуктивный успех.

Introduction

Animal olfactory cues contain a vast amount of information that plays an important role in their life and population processes. The odors play a special role in the relations between the sexes and ensure the process of mating (Brennan, Zufall, 2006; Arakawa et al., 2008). Most often, the rodents use urinary tags for information transfer (Hurst, Beynon, 2004). Urine could be considered as the body fluid with the highest capability to “yield” different volatile organic compounds (VOC) that could be used in chemocommunication (Novotny et al., 1999b). The complexity of mouse urine volatile profile has been described in a number of publications (Novotny et al., 2007; Schaefer et al., 2010). Through GC/MS analysis, more than two hundred VOCs were found on the chromatographic profiles of mouse urine, and for nearly half of them chemical structure was identified (Schwende et al., 1986; Jemiolo et al., 1987; Röck et al., 2007; Zhang et al., 2007; Schaefer et al., 2010; Liu et al., 2017). Several substances were described as unique mouse urine constituents, which are not present in urine of any other species – the mouse pheromones (Novotny et al., 2007). The biological activity of their majority has already been studied (Novotny et al., 1985, 1990, 1999b; Jemiolo et al., 1986). The role of other urinary volatile metabolites has been studied less than that of pheromones but they are also involved in the process of chemocommunication. Urinary metabolites form an odor background, which reflects individual features such as diet, stress level, genotype and others (Zhang et al., 2007; Schaefer et al., 2010).

Most known male pheromones, such as: 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole and 3,4-dihydro-exo-brevicomine (Jemiolo et al., 1985), 1-hexadecanol and 1-hexadecanol acetate (Zhang et al., 2007), α - and β -farnesene (Jemiolo et al., 1991), MTMT (Lin et al., 2005), and darcin (Liu et al., 2017) are highly attractive for female mice. A lot of male pheromones, such as: 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole, 3,4-dihydro-exo-brevicomine, α - and β -farnesene, 6-hydroxi-6-methyl-3-heptanone (Novotny et al., 1999a), and 2-isopropyl-4,5-dihydrothiazole have a stimulating effect on puberty in females (Osada et al., 2008). Wherein some of them: 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole, 3,4-dihydro-exo-brevicomine (Jemiolo et al., 1986), α - and β -farnesene (Ma et al., 1999) can stimulate the estrus synchronization in female population (Whitten et al., 1968). Now it is known as Whitten effect. Beside this, all above-mentioned pheromones induce the estrus cycle (Jemiolo et al., 1986; Ma et al., 1999).

Moreover, it was shown that the females of mice, rats, and voles could discriminate males. For examples, only by the scent of urine females can discriminate the genotype of

males (Penn, Potts, 1998; Roberts, Gosling, 2003; Ilmonen et al., 2009; Manser et al., 2015), their maturity (Osada et al., 2003, 2008), hierarchy status (Drickamer, 1992; Veyrac et al., 2011), parasite load (Kavaliers, Colwell, 1995; Willis, Poulin, 2000), immunocompetence (Zala et al., 2004; Gerlinskaya et al., 2012), and infection status (Moshkin et al., 2001, 2002; Zala et al., 2015).

Now it is known that the free choice of a partner ensures the birth of the most viable offspring. In experiments on various species of animals it was shown that the survival rate from the moment of birth till reaching sexual maturity is significantly higher in individuals born when mating occurs in accordance with the free behavioral choice of a partner, compared to that when crossing contrary to choice (Drickamer et al., 2000; Gowaty et al., 2007; Nelson et al., 2013; Raveh et al., 2014). However, this result was obtained in experiments where females had direct contact with a partner by hearing, seeing and sniffing them. In these experiments wild-caught animals or their outbred offspring were used. To explain the positive effect of sexual choice, the hypotheses of “good genes” (Kokko, 2001), phenogenetic complementarity of the mother and father (Andersson, 2006), heterozygosity (Ilmonen et al., 2009), and Fisher’s “attractive sons” (Kokko, 2001) are used. The basis of all these theories is the choice of a partner based on his genotype. Theoretically, paternal effects may be associated with traits acquired during ontogeny and not dependent on genes, but this theory has not enough evidence at the moment. Therefore, for this study, we chose CD-1 mice, which have genetic diversity and are a frequently used model object of research.

In this study we attempt to determine whether the females will be able to recognize the successfully mated males only by urine tag, and, moreover, what kind of components detected in their urine by gas chromatography correlate with attractiveness of males for females in Olfactory test.

Materials and methods

Mice and sample collection. We used 19 males and 86 (38+48) females of an outbred CD-1 mouse strain (2–3 months old) from the Centre for Genetic Resources of Laboratory Animals at the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS (Novosibirsk, Russia) in this study. All animals had SPF-status.

The experiment was carried out in the spring-summer period. Mice were kept for 2 weeks in single-sex groups of four-five animals per standard cage (35 cm × 25 cm × 12 cm) with sawdust bedding at room temperature (20–22 °C) under a 14/10 h light/dark cycle (lights off at 18:00). Water and

food pellets (Zoomir, St. Petersburg, Russia) were available ad libitum. Following the recommendation of Lombardi and Vandenberg (Lombardi, Vandenberg, 1977), we added soiled male bedding to female cages daily to support regular estrus cycles. Five days before the experiment males were placed into individual cages. On the day 1 of the experiment, 2 females were placed into each male cage at the time of lights off. Females were housed with males for 6 days, except for mated females (see below). Urine samples were collected on the 6th day. Urine was collected through gentle abdominal massage while the male was held over an Eppendorf microcentrifuge tube. The urine samples were divided into two aliquots, then immediately frozen and stored at -80°C . Due to the fact that we did not spend more than 1 minute obtaining a urine sample from an individual mouse, only 16 out of 19 secondary aliquots were collected.

In procedures with animals, we used the principles specified in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. All animal protocols were approved by the Institutional Bioethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics (No. 81).

Male reproductive success. Two females housed with males during 6 days were examined daily 2–3 hours after the lights were turned on for the presence of vaginal plugs. Females with vaginal plugs were removed and housed individually. After 6 days males were removed and sacrificed to assess the testosterone level in blood, body weight, weight of testes, seminal vesicles and preputial glands. Seminal vesicles were removed and weighed together with coagulation glands. A male was considered reproductively successful if at least one female kept with him turned out to be pregnant. We got 7 successful and 9 unsuccessful males. The time of cohabiting a male with females was chosen in accordance with (Gerlinskaya et al., 2012). Since in 96 % of females that have access to the smell of a male, the length of the estrous cycle does not exceed 5.5 days (Jemiolo et al., 1986), within 6 days, a female introduced at any stage of the cycle will be in oestrus at least once, which is necessary for fertile mating.

Olfactory test. Separate females, who did not participate in reproduction, were tested. In behavioral testing, a preliminary acquaintance with the smell of contaminated bedding can have a decisive effect on the ability of females to recognize and increase interest in the volatile components of male urine (Moncho-Bogani et al., 2002). Therefore, bedding contaminated by males was added to the cages of females on daily basis. The day before the experiment, the females were placed individually and the test was performed in a home cage. Urine was thawed for 20 minutes at room temperature. 20 μl of urine were applied to filter paper and placed in a vial (a single-use 5 mm truncated tip of an automatic pipette). That is why the females had access only to the volatile compounds of urine. The tip was fixed to the mesh lid of the cage in the corner. Females observed one accidentally selected urine sample (Dougherty, Shuker, 2015; Dougherty, 2020). 16 samples were examined. During the 10-minute test, the number of approaches to sniff (number of sniffs), the time spent sniffing the sample in seconds (total time of sniffs) and the time of the first approach to the stimulus in seconds (latency time of sniffs) were taken into account. After the test, a swab was

taken from the females to determine the stage of the estrous cycle. A sample from each male was tested on 3 females, the data on their testing were averaged for further calculations (or Repeated measure ANOVA was used if specified). The stage of the cycle had a significant effect on the behavior of females: at the proestrus stage, the females approached the urine samples significantly earlier than the females at the diestrus stage ($p = 0.039$, LSD test). There were no significant differences in other stages and no effect on other types of behavior. To exclude the influence of the cycle stage on further statistical analysis, residual variances were used.

Preparation of urine samples and concentration procedure. Mouse urine was thawed and 20 μl of urine from each male was then transferred to 7 ml glass vials with caps containing gastight PTFE/Silicone septum (Supelco). The vials with urine were then heated for 15 min at 40°C for equilibration, and also for denaturation of urinary proteins that bind some volatiles. Immediately after the heating sample headspace was concentrated on 6 mg of Tenax (Chrompack, Netherlands) using special sorbent traps designed for EKHO-A-PID gas chromatograph (IPGG SB RAS, Novosibirsk, Russia). For concentration we used filtered air flow at flow-rate of 40 ml/min. In total we pumped 80 ml urine headspace and air mix through the sorbent layer.

The samples were thawed and prepared consistently one after another with 20 min intervals, so preparation of samples was done consecutively so each sample was run on the Gas Chromatograph (GC) within 20 min (including 15 min of heating) after defrosting. Filtered air samples were routinely run as a control.

GC analysis of urine VOCs and data preparation. An EKHO-A-PID gas chromatograph with original software (Sorbatek, IPGG SB RAS, Novosibirsk, Russia) was used in our study. 19 samples of mouse urine were run in the GC using the non-polar GC column (polidimethylsiloxane polycapillary, $n = 920$ capillaries) SE-30 22 cm \times 0.6 mm with 40 μm coating (IPGG SB RAS). The temperature of the column was constant at 50°C during the whole separation. The temperature of the injection port was set at 180°C . Filtered ambient air with a constant flow-rate of 20 ml/min was used as a carrier gas throughout the analysis. The duration of each analysis was set at 300 s. For further statistical calculations, we used the amplitudes of the peaks.

MS analysis. Urine samples were treated on a custom-made GC/MS system (IPGG SB RAS, Novosibirsk, Russia), specialized for fast VOC analysis in air with a non-polar column HP-5 similar to SE-30 (Makas, Troshkov, 2004). Heated urine headspace was concentrated on Tenax as described above. A non-polar column HP-5, 15 m \times 0.32 mm with 1 μm film (Agilent technologies, USA), was used for separation. The temperature of the column was constant at 45°C for 5 minutes, then it was programmed with the rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 150°C . The temperature of the injection port was set at 280°C . Helium was used as the gas-carrier with a flow-rate of 2 ml/min.

The operating parameters for the mass spectrometer were set as follows: scan rate 0.5 s from 45 to 250 m/z; ion source temperature set to 180°C , with electron impact ionization energy at 70 eV. Identification of compounds was performed using NIST/EPA/NIH libraries (ver. 2.0.2008) and information from literature (Schwende et al., 1986; Novotny et al., 2007).

The GC/MS data analysis was performed by the AMDIS program (NIST, USA).

Additionally retention times of several standard compounds were analyzed on both columns to use them as reference points in subsequent procedures. The standard compounds were purchased from Acros Organics (Belgium) and Sigma-Aldrich (USA). For each peak in question we found reference compounds among pure chemicals to make the retention time of the reference compound as close as possible to the retention time of the target peak. Thus, we were able to surround the target peaks on the chromatogram with one or two reference points. For this purpose benzene, toluene, m-xylene, 2,5-dimethylpyrazine and nonane were chosen. Thus, we were able to confine the intervals where the target peaks could be found. Next, we compared the area and the amplitude of the peaks detected in the localized intervals with the same parameters of the target peaks obtained on EKHO-A-PID and found three peaks (RT 4.2, RT 7.9 and RT 87.7) caught on GC/MS that satisfied all requirements. We identified the peaks as three dihydrofuran (DHF) derivatives – the dehydration products of lactol – using data reported in the literature. The characteristic losses of m/z 126, m/z 111, m/z 97, m/z 83, m/z 69, and m/z 57 were identical to those obtained in the earlier studies with synthetic analogues of cyclic enol ethers (Novotny et al., 2007). Moreover, the ratio of target peaks in our study (1:0.32:0.12) was nearly the same as the ratio of cyclic enol ethers (1:0.30:0.10) in mouse urine calculated in one of the studies mention above (Harvey et al., 1989). This provides additional confidence that our target compounds were dihydrofuran derivatives: 5,5-dimethyl-2-ethyl-4,5-DHF, E-5,5-dimethyl-2-ethylenetetrahydrofuran, and Z-5,5-dimethyl-2-ethylenetetrahydrofuran.

Statistical analysis. To analyze behavior, we used Repeated measure ANOVA, since each male sample was tested by 3 females. To compare the groups by the content of components, we used One way ANOVA. We used Spearman correlation

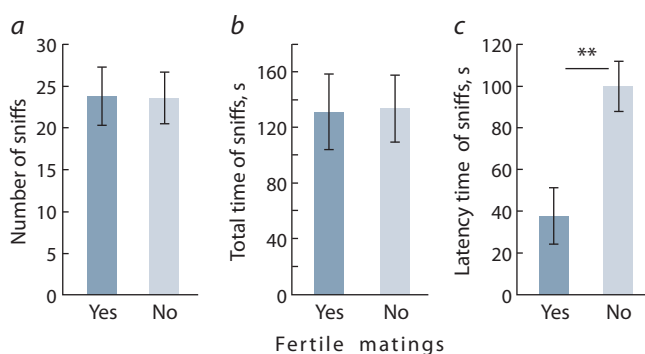


Fig. 1. Behavioral reaction of naive females on smell of urine of male mice with various number of fertile matings: a, number of sniffs; b, total time of sniffs; c, latency time of sniffs.

$N(\text{No}) = 9\text{♂}$; $N(\text{Yes}) = 7\text{♂}$; ** $p < 0.01$, Repeated measure ANOVA.

coefficient to count correlation ratios in this study. No data were removed from calculations. All experimental data were obtained blindly, the belonging of the animals to the groups was indicated only at the stage of data analysis. The level of significance used was $p < 0.05$.

Results

In Olfactory test, females had a shorter latency time of sniffs when studying urine samples from males who had already successfully procreated offsprings after 6 days of being kept with other females $F_{1,14} = 0.00$, $p = 0.963$ (Fig. 1, c). The presence of fertile matings in a male did not have a significant effect on the number of sniffs ($F_{1,14} = 0.00$, $p = 0.963$) and total time of sniffs ($F_{1,14} = 0.00$, $p = 0.945$).

Chromatographic study of volatile components of male urine samples revealed 12 peaks (Table 1). To understand whether the behavioral response of females is really related to differences in the content of the detected components, we

Table 1. The relationship between the response of females in Olfactory test and the amplitude of chromatographic peaks in the urine of males

Peaks' retention time (RT)	Behavioral traits		
	Number of sniffs $N = 16$	Total time of sniffs $N = 16$	Latency time of sniffs $N = 16$
2.9	$r_s = -0.25, p = 0.351$	$r_s = -0.14, p = 0.608$	$r_s = -0.31, p = 0.247$
3.3	$r_s = -0.23, p = 0.398$	$r_s = -0.17, p = 0.537$	$r_s = 0.16, p = 0.545$
4.2	$r_s = 0.04, p = 0.880$	$r_s = 0.15, p = 0.587$	$r_s = -0.48, p = 0.063$
5.4	$r_s = -0.39, p = 0.138$	$r_s = -0.04, p = 0.879$	$r_s = -0.03, p = 0.927$
7.9	$r_s = 0.00, p = 0.991$	$r_s = 0.04, p = 0.897$	$r_s = -0.57, p = 0.021$
9.9	$r_s = -0.38, p = 0.147$	$r_s = -0.15, p = 0.579$	$r_s = -0.27, p = 0.305$
56.8	$r_s = -0.48, p = 0.060$	$r_s = 0.09, p = 0.753$	$r_s = -0.18, p = 0.513$
64.8	$r_s = -0.03, p = 0.897$	$r_s = 0.08, p = 0.762$	$r_s = -0.06, p = 0.820$
74.8	$r_s = -0.06, p = 0.824$	$r_s = 0.12, p = 0.652$	$r_s = 0.13, p = 0.637$
87.7	$r_s = 0.04, p = 0.880$	$r_s = -0.03, p = 0.922$	$r_s = -0.68, p = 0.004$
110.6	$r_s = 0.03, p = 0.914$	$r_s = -0.24, p = 0.368$	$r_s = -0.42, p = 0.107$
170.45	$r_s = 0.29, p = 0.272$	$r_s = -0.01, p = 0.983$	$r_s = -0.47, p = 0.063$

Note. Significant differences are given in bold.

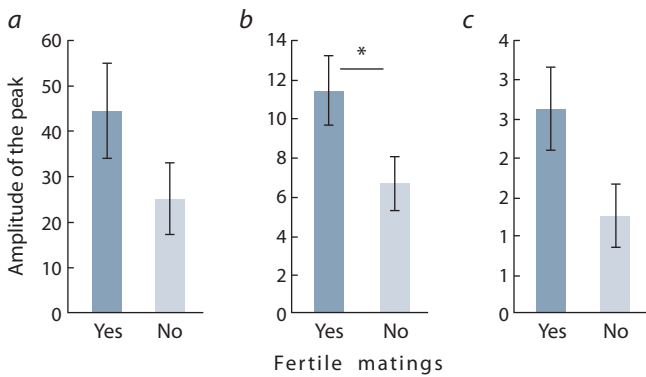


Fig. 2. Amplitude differences in peaks RT 4.2 (a), RT 7.9 (b) and RT 87.7 (c) found in the urine of male mice that had or didn't have fertile mating. $N(0) = 12\sigma; N(1) = 7\sigma; * p < 0.05$, One way ANOVA.

performed a correlation analysis of the behavior characteristics and the obtained peaks of urine. A significant negative correlation was found between the latency time of sniffs and the amplitude of peaks RT 7.9 and RT 87.7 (see Table 1). No significant relationship was found between the amplitude of the peaks and the number of sniffs, as well as the total time of sniffs.

Mass spectrometric analysis of male urine samples showed that the RT 7.9 peak corresponds to the known compound E-5,5-dimethyl-2-ethylenetetrahydrofuran and the RT 87.7 peak corresponds to Z-5,5-dimethyl-2-ethylenetetrahydrofuran. At the same time, one more dihydrofuran derivative was identified: 5,5-dimethyl-2-ethyl-4,5-DHF, RT 4.2. This compound did not show a significant correlation value with the behavioral characteristics of females (see Table 1). All three compounds are derivatives of the known male mouse pheromone 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone (HMH) (Harvey et al., 1989).

We evaluated the relationship between the amplitude of the chromatographic peaks of dihydrofurans and the reproduc-

tive success of males. The amplitude of the RT 7.9 peak was found to be significantly higher in the urine of males who had fertilized at least one female, compared to the urine of males who had fertilized no females (Fig. 2, Fig. 3). The RT 4.2 and RT 87.7 peaks showed the same trend, but the p -value was below the threshold of statistical significance ($F_{1,17} = 2.19, p = 0.157$ and $F_{1,17} = 4.20, p = 0.056$, respectively).

Analysis of the relationship between the amplitude of the three peaks under study and the level of testosterone in the blood plasma showed significant positive correlation of the amplitude of the RT 4.2, RT 7.9 and RT 87.7 peaks. A similar correlation was observed for the relationship between preputial gland weight and the RT 4.2 and RT 7.9 peaks. Correlation analysis of the studied peaks with body weight, weight of seminal vesicles and testes showed no significant values (Table 2).

It is important to note that body weight, weight of testes, seminal vesicles, preputial glands, and plasma testosterone level alone are not reliable indicators of male reproductive success (Table 3).

Discussion

Two decades ago, it was shown for the first time that females can identify males, mating with which leads to greater reproductive success (Drickamer et al., 2000). This result has been repeated many times in different animal species (Drickamer et al., 2003; Gowaty et al., 2007; Nelson et al., 2013; Raveh et al., 2014). Nevertheless, direct contact with a partner and free access to all signals from a potential sexual partner in these experiments did not allow getting closer to the understanding of the selection mechanisms. In the present study, we used only volatile compounds of the male urine to be tested by females, and found that based on the smell of urine only, females could identify reproductively effective males. It turned out that the experimental females in Olfactory test approached the urine of successful males earlier (see Fig. 1, c) despite the fact that they performed an equal number of sniffs and had the same total time of sniffs (see Fig. 1, a, b).

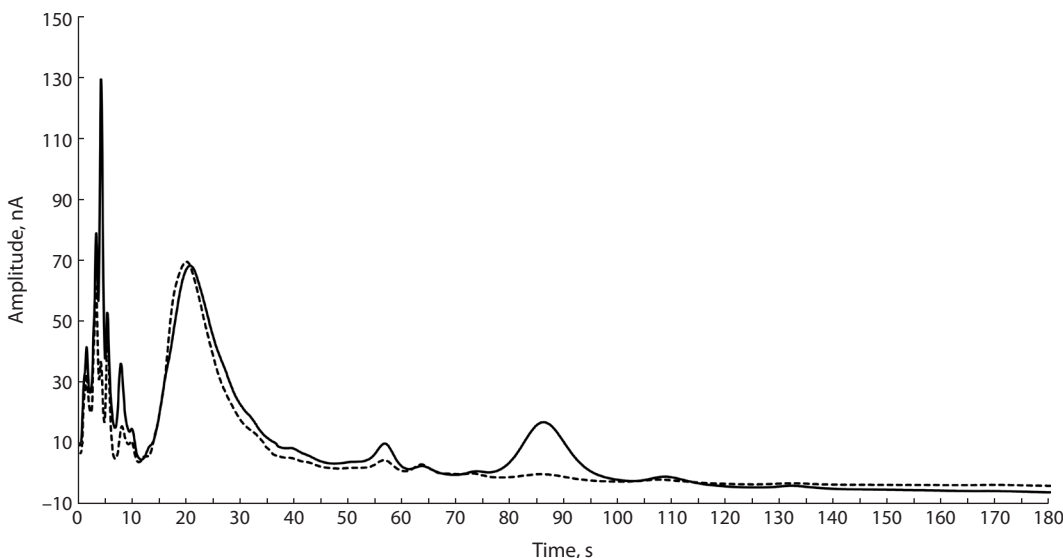


Fig. 3. Sample chromatograms from a male with fertile mating (solid line) and without fertile mating (dotted line).

Table 2. Correlation between physiological characteristics, testosterone level and amplitudes of target peaks (Spearman correlation coefficients)

Physiological characteristics	Target peaks		
	RT 4.2 N = 19	RT 7.9 N = 19	RT 87.7 N = 19
Body weight, g	$r_s = 0.21, p = 0.383$	$r_s = 0.17, p = 0.491$	$r_s = 0.18, p = 0.464$
Weight of testes, mg	$r_s = 0.11, p = 0.651$	$r_s = 0.14, p = 0.579$	$r_s = 0.10, p = 0.681$
Weight of seminal vesicles, mg	$r_s = 0.23, p = 0.339$	$r_s = 0.26, p = 0.279$	$r_s = 0.09, p = 0.713$
Weight of preputial glands, mg	$r_s = 0.57, p = 0.011$	$r_s = 0.58, p = 0.010$	$r_s = 0.48, p = 0.038$
Plasma testosterone, ng/ml	$r_s = 0.46, p = 0.046$	$r_s = 0.51, p = 0.027$	$r_s = 0.27, p = 0.260$

Note. Significant differences are given in bold.

Table 3. Mean values of physiological characteristics depending on the reproductive success of males

Physiological characteristics	Fertile matings, Mean ± SE	No fertile matings, Mean ± SE	One way ANOVA
Body weight, g	33.70 ± 1.09	32.54 ± 0.52	$F_{1,17} = 1.17, p = 0.295$
Weight of testes, mg	201.00 ± 8.29	210.75 ± 6.54	$F_{1,17} = 0.84, p = 0.373$
Weight of seminal vesicles, mg	177.57 ± 10.57	181.67 ± 9.15	$F_{1,17} = 0.08, p = 0.781$
Weight of preputial glands, mg	70.00 ± 6.79	61.50 ± 2.19	$F_{1,17} = 2.11, p = 0.164$
Plasma testosterone, ng/ml	6.28 ± 1.57	7.29 ± 1.35	$F_{1,17} = 0.22, p = 0.642$

The search for markers of male reproductive efficiency using gas chromatographic analysis of male urine samples showed that the behavior of females correlated with the amplitude of the dihydrofuran peaks (see Table 1).

Previously, DHFs have already been detected in significant amounts in the chromatograms of male mouse urine (Schwende et al., 1986; Jemiolo et al., 1987; Harvey et al., 1989; Novotny et al., 1999b). While studying the origin of these cyclic enol ethers in mouse urine S. Harvey et al. (Harvey et al., 1989) showed that DHFs originate from the tautomeric mixture of 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone and lactol via dehydration in the inlet port of gas chromatograph under high temperature. It turned out that DHFs are not presented in the mouse urine by themselves, but their peaks in the chromatogram reflect the content of their precursor 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone (Harvey et al., 1989). Mutual precursors of target compounds explain very high coefficients of intercorrelation between these components, exceeding 0.90 ($p < 0.001$). Thus, the behavior of females correlated with compounds that were previously shown to reflect the content of 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone in urine of males.

When studying the effects of HMH, it turned out that 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone interacts with vomeronasal receptors (Del Punta et al., 2002), and therefore can trigger behavioral and physiological responses in females. HMH is known as a male mouse pheromone that accelerates puberty in female mice (Novotny et al., 1999a). Here we demonstrated that quantity of HMH in urine of a male reflects its ability to make fertile matings (see Fig. 2). Males with a lower level of this pheromone did not mate any of the two females for 6 days of joint maintenance. Perhaps exactly this indirectly explains the effect of a decrease in fertile matings in aged

male mice, as shown earlier (Parkening et al., 1988), since HMH decreases in aged males (Osada et al., 2008; Varshavi et al., 2018), and in the work of Schaefer with colleagues HMH has been associated with the maturation state (Schaefer et al., 2010). In our work, when analyzing correlations with androgen-dependent characteristics of males, it turned out that amplitudes of the peaks correlated positively with plasma testosterone and weight of the preputial glands (see Table 2). However, reproductive success was not directly related to physiological characteristics of males (see Table 3). Taken together, these data show that 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone reflects reproductive quality of male mice.

On the other hand, it has previously been shown that HMH does not affect the attractiveness of male urine samples to females (Osada et al., 2008). These conclusions about male attractiveness were based only on the total time of sniffs, which is consistent with our results. We also demonstrated no relationship between the level of this pheromone in urine and the total time of sniffs (see Table 1). In addition to this, when assessing behavioral response of females to the stimulus, we found that the HMH content correlated with the latency time of sniffs (see Table 1), which indicates the importance of assessing other parameters of the females' behavior, and not just the total time of sniffs.

Conclusion

Identification of markers of reproductively successful males is an important task. Its solution does not have only fundamental importance, but will also allow targeted selection of more successful males when breeding animals. Urine, which is an accessible and unlimited resource, is of greatest interest in this regard. The observed relationships between reproduc-

tive success and the HMH content in urine require further research to understand the dynamics of this compound excretion at different stages of male ontogenesis, with different reproductive experience, in different conditions of social and microbiological environment.

References

- Andersson M. Condition-dependent indicators in sexual selection: development of theory and tests. In: Lucas J.R., Simmons L.W. (Eds.) *Essays in Animal Behaviour: Celebrating 50 Years of Animal Behaviour*. Elsevier, 2006;253-267.
- Arakawa H., Blanchard D.C., Arakawa K., Dunlap C., Blanchard R.J. Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008;32(7):1236-1248. DOI 10.1016/j.neubiorev.2008.05.012.
- Brennan P.A., Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*. 2006;444(7117):308-315. DOI 10.1038/nature05404.
- Del Punta K., Leinders-Zufall T., Rodriguez I., Jukam D., Wysocki C.J., Ogawa S., Zufall F., Mombaerts P. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature*. 2002;419(6902):70-74. DOI 10.1038/nature00955.
- Dougherty L.R. Designing mate choice experiments. *Biol. Rev.* 2020; 95(3):759-781. DOI 10.1111/brv.12586.
- Dougherty L.R., Shuker D.M. The effect of experimental design on the measurement of mate choice: a meta-analysis. *Behav. Ecol.* 2015; 26(2):311-319. DOI 10.1093/beheco/aru125.
- Drickamer L.C. Behavioral selection of odor cues by young female mice affects age of puberty. *Dev. Psychobiol.* 1992;25(6):461-470. DOI 10.1002/dev.420250606.
- Drickamer L.C., Gowaty P.A., Holmes C.M. Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance. *Anim. Behav.* 2000;59(2):371-378. DOI 10.1006/anbe.1999.1316.
- Drickamer L.C., Gowaty P.A., Wagner D.M. Free mutual mate preferences in house mice affect reproductive success and offspring performance. *Anim. Behav.* 2003;65(1):105-114. DOI 10.1006/anbe.2002.2027.
- Gerlinskaya L.A., Shnyder E.P., Dotsenko A.S., Maslennikova S.O., Zavjalov E.L., Moshkin M.P. Antigen-induced changes in odor attractiveness and reproductive output in male mice. *Brain Behav. Immun.* 2012;26(5):451-458. DOI 10.1016/j.bbi.2011.11.010.
- Gowaty P.A., Anderson W.W., Bluhm C.K., Drickamer L.C., Kim Y.K., Moore A.J. The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104(38):15023-15027. DOI 10.1073/pnas.0706622104.
- Harvey S., Wiesler D., Novotny M. Formation of cyclic enol ethers from a labile biological precursor: an example of analytical artifacts. *J. Chromatogr.* 1989;491(1):27-36. DOI 10.1016/S0378-4347(00)82816-9.
- Hurst J.L., Beynon R.J. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays*. 2004;26(12):1288-1298. DOI 10.1002/bies.20147.
- Ilmonen P., Stundner G., Thoß M., Penn D.J. Females prefer the scent of outbred males: good-genes-as-heterozygosity? *BMC Evol. Biol.* 2009;9:104. DOI 10.1186/1471-2148-9-104.
- Jemiolo B., Alberts J., Sochinski-Wiggins S., Harvey S., Novotny M. Behavioral and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Anim. Behav.* 1985; 33(4):1114-1118. DOI 10.1016/S0003-3472(85)80170-6.
- Jemiolo B., Harvey S., Novotny M. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83(12):4576-4579. DOI 10.1073/pnas.83.12.4576.
- Jemiolo B., Andreolini F., Wiesler D., Novotny M. Variations in mouse (*Mus musculus*) urinary volatiles during different periods of pregnancy and lactation. *J. Chem. Ecol.* 1987;13(9):1941-1956. DOI 10.1007/BF01014677.
- Jemiolo B., Xie T.M., Novotny M. Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals. *Physiol. Behav.* 1991;50(6):1119-1122. DOI 10.1016/0031-9384(91)90570-E.
- Kavaliers M., Colwell D.D. Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1995;261(1360):31-35. DOI 10.1098/rspb.1995.0113.
- Kokko H. Fisherian and "good genes" benefits of mate choice: how (not) to distinguish between them. *Ecol. Lett.* 2001;4(4):322-326. DOI 10.1046/j.1461-0248.2001.00224.x.
- Lin D.Y., Zhang S.Z., Block E., Katz L.C. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*. 2005;434(7032):470-477. DOI 10.1038/nature03414.
- Liu Y.J., Guo H.F., Zhang J.X., Zhang Y.H. Quantitative inheritance of volatile pheromones and darcin and their interaction in olfactory preferences of female mice. *Sci. Rep.* 2017;7(1):2094. DOI 10.1038/s41598-017-02259-1.
- Lombardi J.R., Vandenberg J.G. Pheromonally induced sexual maturation in females: regulation by the social environment of the male. *Science*. 1977;196(4289):545-546. DOI 10.1126/science.557838.
- Ma W., Miao Z., Novotny M.V. Induction of estrus in grouped female mice (*Mus domesticus*) by synthetic analogues of preputial gland constituents. *Chem. Senses*. 1999;24(3):289-293. DOI 10.1093/chemse/24.3.289.
- Makas A.L., Troshkov M.L. Field gas chromatography-mass spectrometry for fast analysis. *J. Chromatogr. B.* 2004;800(1-2):55-61. DOI 10.1016/j.jchromb.2003.08.054.
- Manser A., König B., Lindholm A.K. Female house mice avoid fertilization by *t* haplotype incompatible males in a mate choice experiment. *J. Evol. Biol.* 2015;28(1):54-64. DOI 10.1111/jeb.12525.
- Moncho-Bogani J., Lanuza E., Hernández A., Novejarque A., Martínez-García F. Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? *Physiol. Behav.* 2002;77(1):167-176. DOI 10.1016/S0031-9384(02)00842-9.
- Moshkin M.P., Kolosova I.E., Novikov E.A., Litvinova E.A., Mershieva L.V., Mak V.V., Petrovskii D.V. Co-modulation of the immune function and the reproductive chemosignals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2001;14:43-51.
- Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Morozova O., Bakhvalova V., Evsikov V. Behaviour, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus. *Psychoneuroendocrinology*. 2002;27(5):603-608. DOI 10.1016/S0306-4530(01)00096-8.
- Nelson A.C., Colson K.E., Harmon S., Potts W.K. Rapid adaptation to mammalian sociality via sexually selected traits. *BMC Evol. Biol.* 2013;13:81. DOI 10.1186/1471-2148-13-81.
- Novotny M., Harvey S., Jemiolo B., Alberts J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985;82(7):2059-2061. DOI 10.1073/pnas.82.7.2059.
- Novotny M., Harvey S., Jemiolo B. Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia*. 1990;46(1):109-113. DOI 10.1007/BF01955433.
- Novotny M.V., Jemiolo B., Wiesler D., Ma W., Harvey S., Xu F., Xie T., Carmack M. A unique urinary constituent, 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone, is a pheromone that accelerates puberty in female mice. *Chem. Biol.* 1999a;6(6):377-383. DOI 10.1016/S1074-5521(99)80049-0.
- Novotny M.V., Ma W., Wiesler D., Zidek L. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1999b;266(1432):2017-2022. DOI 10.1098/rspb.1999.0880.
- Novotny M.V., Soini H.A., Koyama S., Wiesler D., Bruce K.E., Penn D.J. Chemical identification of MHC-influenced volatile compounds in mouse urine. I: Quantitative proportions of major chemosignals. *J. Chem. Ecol.* 2007;33(2):417-434. DOI 10.1007/s10886-006-9230-9.
- Osada K., Yamazaki K., Curran M., Bard J., Smith B.P., Beauchamp G.K. The scent of age. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2003;270(1518):929-933. DOI 10.1098/rspb.2002.2308.

- Osada K., Tashiro T., Mori K., Izumi H. The identification of attractive volatiles in aged male mouse urine. *Chem. Senses*. 2008;33(9):815-823. DOI 10.1093/chemse/bjn045.
- Parkening T.A., Collins T.J., Au W.W. Paternal age and its effects on reproduction in C57BL/6N mice. *J. Gerontol.* 1988;43(3): B79-B84. DOI 10.1093/geronj/43.3.B79.
- Penn D.J., Potts W.K. Untrained mice discriminate MHC-determined odors. *Physiol. Behav.* 1998;64(3):235-243. DOI 10.1016/S0031-9384(98)00052-3.
- Raveh S., Sutalo S., Thonhauser K.E., Thoß M., Hettzey A., Winkelker F., Penn D.J. Female partner preferences enhance offspring ability to survive an infection. *BMC Evol. Biol.* 2014;14:14. DOI 10.1186/1471-2148-14-14.
- Roberts S.C., Gosling L.M. Genetic similarity and quality interact in mate choice decisions by female mice. *Nat. Genet.* 2003;35(1):103-106. DOI 10.1038/ng1231.
- Röck F., Hadeler K.P., Rammensee H.G., Overath P. Quantitative analysis of mouse urine volatiles: in search of MHC-dependent differences. *PLoS One.* 2007;2(5):e429. DOI 10.1371/journal.pone.0000429.
- Schaefer M.L., Wongravee K., Holmboe M.E., Heinrich N.M., Dixon S.J., Zeskind J.E., Kulaga H.M., Brereton R.G., Reed R.R., Trevejo J.M. Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chem. Senses*. 2010; 35(6):459-471. DOI 10.1093/chemse/bjq032.
- Schwende F.J., Wiesler D., Jorgenson J.W., Carmack M., Novotny M. Urinary volatile constituents of the house mouse, *Mus musculus*, and their endocrine dependency. *J. Chem. Ecol.* 1986;12(1):277-296. DOI 10.1007/BF01045611.
- Varshavi D., Scott F.H., Varshavi D., Veeravalli S., Phillips I.R., Veselkov K., Strittmatter N., Takats Z., Shephard E.A., Everett J.R. Metabolic biomarkers of ageing in C57BL/6J wild-type and flavin-containing monooxygenase 5 (FMO5)-knockout mice. *Front. Mol. Biosci.* 2018;5:28. DOI 10.3389/fmolb.2018.00028.
- Veyrac A., Wang G., Baum M.J., Bakker J. The main and accessory olfactory systems of female mice are activated differentially by dominant versus subordinate male urinary odors. *Brain Res.* 2011; 1402:20-29. DOI 10.1016/j.brainres.2011.05.035.
- Whitten W.K., Bronson F.H., Greenstein J.A. Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air. *Science*. 1968; 161(3841):584-585. DOI 10.1126/science.161.3841.5.
- Willis C., Poulin R. Preference of female rats for the odours of non-parasitized males: the smell of good genes. *Folia Parasitol.* 2000; 47(1):6-10. DOI 10.14411/fp.2000.002.
- Zala S.M., Potts W.K., Penn D.J. Scent-marking displays provide honest signals of health and infection. *Behav. Ecol.* 2004;15(2):338-344. DOI 10.1093/beheco/arh022.
- Zala S.M., Bilak A., Perkins M., Potts W.K., Penn D.J. Female house mice initially shun infected males, but do not avoid mating with them. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2015;69:715-722. DOI 10.1007/s00265-015-1884-2.
- Zhang J.X., Rao X.P., Sun L., Zhao C.H., Qin X.W. Putative chemical signals about sex, individuality, and genetic background in the preputial gland and urine of the house mouse (*Mus musculus*). *Chem. Senses*. 2007;32(3):293-303. DOI 10.1093/chemse/bjl058.

ORCID ID

A.S. Khotkina orcid.org/0000-0001-5379-9977
E.L. Zavjalov orcid.org/0000-0002-9412-3874
L.A. Gerlinskaya orcid.org/0000-0002-8118-1362
D.V. Petrovskii orcid.org/0000-0002-0623-0363
M.P. Moshkin orcid.org/0000-0002-5388-2946

Funding. The study of females behavior was supported by the budget project (FWNR-2022-0004). The GC/MS study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 20-14-00055. The studies are implemented using the equipment of the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at ICG SB RAS, supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation (Unique identifier of the project RFMEFI62119X0023).

Acknowledgements. We thank Professor Milos Novotny for the data of mass-spectra of synthetic cyclic enol ethers obtained in his laboratory in Indiana University.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received December 27, 2022. Revised March 10, 2023. Accepted March 13, 2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Дифференциация *Bos grunniens* и *Bos taurus* на основании полиморфизма STR-локусов

К.Б. Чекиров¹, Ж.Т. Исакова²✉, В.Н. Кипень³, М.И. Ирсадиев², С.Б. Мукеева², К.А. Айтбаев², Г.А. Шаршеналиева⁴, С.Б. Бейшеналиева⁴, Б.У. Кыдыралиева¹

¹ Кыргызско-Турецкий университет «Манас», Бишкек, Кыргызская Республика

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, Кыргызская Республика

³ Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

⁴ Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева, Бишкек, Кыргызская Республика

✉ jainagul@mail.ru

Аннотация. Дифференциация близкородственных биологических видов с использованием методов молекулярно-генетического анализа имеет важное значение для селекционных процессов при разведении сельскохозяйственных животных, создании гибридных линий, поддержании генетической чистоты пород, линий, отводков. Подход к дифференциации *Bos grunniens* и *Bos taurus* на основании полиморфизма STR-локусов будет способствовать поддержанию генетической обособленности данных видов и, как следствие, выявлению гибридных особей. Целью исследования была оценка дифференцирующего потенциала 15 микросателлитных локусов для различения особей домашнего яка (*B. grunniens*), разводимых в высокогорном регионе Калмак-Ашуу (Кочкорский район, Нарынская область, Кыргызская Республика), и крупного рогатого скота (*B. taurus*) трех пород (абердин-ангусская, голштинская и алатауская) с использованием молекулярно-генетического анализа. Образцы были генотипированы по 15 микросателлитным локусам (ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818, CSSM66, ILSTS006 и CSRM60). Двенадцать из рассматриваемых STR-локусов составляли стандартную панель маркеров, рекомендованную ISAG. Статистический анализ данных проводили с использованием программ GenAEx v.6.503, Structure v.2.3.4, PAST v.4.03 и POPHELPER v1.0.10. Анализ субпопуляционной структуры исследуемых выборок в программе Structure v.2.3.4 по данным генотипирования 15 STR-локусов показал, что точность отнесения образца к *B. taurus* составила 99.6 ± 0.4 %, к *B. grunniens* – 99.2 ± 2.6 %. Наибольшим потенциалом для дифференциации *B. grunniens* и *B. taurus* обладали те локусы, для которых рассчитанные значения показателя FST оказались максимальными – BM1818 (0.056), BM1824 (0.041), BM2113 (0.030), CSSM66 (0.034) и ILSTS006 (0.063). Точность классификации *B. grunniens* с использованием только этих пяти микросателлитных локусов составила 98.8 ± 3.4 %, *B. taurus* – 99.1 ± 1.2 %. Предложенный нами подход, основанный на молекулярно-генетическом анализе пяти STR-локусов, может быть использован в качестве экспресс-теста в селекционных и воспроизводительных программах Кыргызстана для *B. grunniens*.

Ключевые слова: домашний як; *Bos grunniens*; крупный рогатый скот; *Bos taurus*; ДНК; микросателлитные маркеры; STR; генотипирование; дифференциация.

Для цитирования: Чекиров К.Б., Исакова Ж.Т., Кипень В.Н., Ирсадиев М.И., Мукеева С.Б., Айтбаев К.А., Шаршеналиева Г.А., Бейшеналиева С.Б., Кыдыралиева Б.У. Дифференциация *Bos grunniens* и *Bos taurus* на основании полиморфизма STR-локусов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(5):488-494. DOI 10.18699/VJGB-23-59

Differentiation of *Bos grunniens* and *Bos taurus* based on STR locus polymorphism

К.Б. Chekirov¹, Zh.T. Isakova²✉, V.N. Kipen³, M.I. Irsaliev², S.B. Mukееva², K.A. Aitbaev², G.A. Sharshenalieva⁴, S.B. Beyshenalieva⁴, B.U. Kydyralieva¹

¹ Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyz Republic

² Research Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyz Republic

³ Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

⁴ Kyrgyz State University named after I. Arabaev, Bishkek, Kyrgyz Republic

✉ jainagul@mail.ru

Abstract. Differentiation of closely related biological species using molecular genetic analysis is important for breeding farm animals, creating hybrid lines, maintaining the genetic purity of breeds, lines and layering. *Bos grunniens* and *Bos taurus* differentiation based on STR locus polymorphism will help maintain the genetic isolation of these species and identify hybrid individuals. The aim of this study is to assess the differentiating potential of 15 microsatellite loci to distinguish between domestic yak (*B. grunniens*) bred in the Kalmak-Ashuu highland region (Kochkor district, Naryn region, Kyrgyz Republic) and cattle (*B. taurus*) of three breeds (Aberdeen-Angus, Holstein and Alatau) using molecular genetic analysis. The samples were genotyped at 15 microsatellite loci (ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122,

SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818, CSSM66, ILSTS006 and CSRM60). Twelve of the loci were from the standard markers panel recommended by ISAG. Statistical analysis was performed using GenAIEx v.6.503, Structure v.2.3.4, PAST v.4.03, and POPHELPER v1.0.10. The analysis of the samples' subpopulation structure using the Structure v.2.3.4 and 15 STR locus genotyping showed that the accuracy of assigning a sample to *B. taurus* was 99.6 ± 0.4 %, whereas the accuracy of assigning a sample to *B. grunniens* was 99.2 ± 2.6 %. Of the 15 STRs, the greatest potential to differentiate *B. grunniens* and *B. taurus* was found in those with the maximal calculated F_{ST} values, including BM1818 (0.056), BM1824 (0.041), BM2113 (0.030), CSSM66 (0.034) and ILSTS006 (0.063). The classification accuracy of *B. grunniens* using only these five microsatellite loci was 98.8 ± 3.4 %, similar for *B. taurus*, 99.1 ± 1.2 %. The proposed approach, based on the molecular genetic analysis of 5 STR loci, can be used as an express test in Kyrgyzstan breeding and reproduction programs for *B. grunniens*.

Key words: domestic yak; *Bos grunniens*; cattle; *Bos taurus*; DNA; microsatellite markers; STR; genotyping; differentiation.

For citation: Chekirov K.B., Isakova Zh.T., Kipen V.N., Irsaliev M.I., Mukeeva S.B., Aitbaev K.A., Sharshenalieva G.A., Beyshe-naliev S.B., Kydyralieva B.U. Differentiation of *Bos grunniens* and *Bos taurus* based on STR locus polymorphism. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):488-494. DOI 10.18699/VJGB-23-59

Введение

Кыргызстан характеризуется многообразием природно-климатических условий. В связи с этим направления животноводства в различных зонах имеют свои особенности. Так, в высокогорье с успехом занимаются яководством, где для его развития созданы благоприятные кормовые условия. В низкогорье и среднегорье разводят крупный рогатый скот (КРС). По сравнению с КРС яки более полно используют низкорослые пастбищные корма, а зимой добывают его из-под снежного покрова толщиной 10–15 см. Мясо яков по всем показателям не уступает говядине и богато белками, а также важными для человека микроэлементами. Молочная продуктивность яков низкая, однако их молоко отличается высоким содержанием жира (5.5–8.6 %), фосфора (0.28 %) и кальция (0.30 %) (Абдыкеримов, 2001). Як не только дает молоко, мясо, шкуру, шерсть, но и служит для перевозки грузов у народов высокогорья Азии (Черткиев, Чортонбаев, 2007). Это животное представляет собой серьезную альтернативу домашнему крупному рогатому скоту; его легко выращивать на больших высотах с очень суровым и холодным климатом. Яки имеют развитую подкожную жировую клетчатку, покрытую сверху густой длинной шерстью, а также острые «стальные» копыта, которые позволяют им передвигаться по крутым каменистым тропам, что не под силу ни одному другому виду домашнего скота.

В отличие от обыкновенного КРС, который сейчас разводят на всех материках земного шара, ареал домашнего яка ограничен высокогорными районами Центральной Азии (Jacques et al., 2021). Причиной этого является само животное: домашний як, как и его дикий родич – тибетский як, отлично приспособлен к жизни в условиях гор и горных плато (Домашние животные Монголии..., 1936). И те и другие обитают в суровом климате высокогорий, где более восьми месяцев в году средняя температура близка к нулю, а минимальная приближается к -50 °С. В таких условиях яки живут круглый год под открытым небом на подножном корме.

Одним из путей дальнейшей интенсификации яководства как самостоятельной отрасли животноводства является совершенствование технологии их содержания, улучшение племенных и продуктивных качеств яков, расширение знаний по их биологии, росту и формированию мясной продуктивности. Изучение генетических особенностей яков, позволяющих им жить в условиях

сурового климата высокогорья, представляет большой практический интерес.

В настоящее время наиболее удобные генетические маркеры для описания генетической структуры популяций разных видов животных, и в частности яков и КРС, – это полиморфные микросателлитные локусы ДНК (STR, short tandem repeat), которые имеют кодоминантный характер наследования и служат незаменимым инструментом при изучении генетических различий не только между животными, но и между популяциями одной породы, а также между породами.

Цель данного исследования – оценка дифференцирующего потенциала 15 STR-локусов (ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818, CSSM66, ILSTS006 и CSRM60) для различения особой биологических видов *Bos grunniens* и *Bos taurus*.

Материалы и методы

Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы крови, взятые у взрослого поголовья 55 домашних яков (*B. grunniens*), разводимых в высокогорном регионе Калмак-Ашуу (Кочкорский район, Нарынская область, Кыргызская Республика), – выборка YAK, а также образцы ДНК крови, взятые у взрослого поголовья 145 коров (*B. taurus*) трех пород – абердин-ангусской ($n = 45$, выборка ABR), голштинской ($n = 50$, выборка HOL) и алатауской ($n = 50$, выборка ALA). При исследовании были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook, Russell, 2001). Образцы были генотипированы по 15 микросателлитным локусам, 12 из которых составляли стандартную панель маркеров, рекомендованную Международным обществом генетики животных (International Society of Animal Genetics, ISAG): ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818. Дополнительно проанализированы микросателлитные локусы CSSM66, ILSTS006 и CSRM60. Последовательность олигонуклеотидов представлена в табл. 1.

Анализ результатов ПЦР проводили методом капиллярного электрофореза с применением автоматического генетического анализатора с лазериндуцированной флуорес-

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидов для 15 STR-локусов

STR-локус	Праймер-F (5'>3')	Праймер-R (5'>3')	Литературный источник
CSSM66	AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	Barendse et al., 1994
BM1824	GAGCAAGGTGTTTTCCAATC	CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	
SPS115	AAAGTGACACAACAGCTTACCAG	AACCGAGTGCCTAGTTGGCTGTG	Bovine Genome Project
CSRM60	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA	AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	
BM1818	AGCTGGGAATATAACCAAAGG	AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	Bishop et al., 1994
ILSTS006	TGTCTGTATTCTGCTGTGG	ACACGGAAGCGATCTAAACG	Brezinsky et al., 1993
TGLA227	GGAATCCAATCTGTTAATTTGCT	ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	Georges, Massey, 1992
TGLA126	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT	TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTC	
TGLA122	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	
TGLA53	GCTTTCAGAAATAGTTTGCAATCA	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	
ETH3	GAACCTGCCTCTCTGCATTGG	ACTCTGCCTGTGCCAAGTAGG	Toldo et al., 1993
ETH10	GTTCCAGGACTGGCCCTGCTAACA	CCTCCAGCCCCTTCTCTTCTC	
ETH225	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT	ACATGACAGCCAGCTGCTACT	Steffen et al., 1993
BM2113	GCTGCCTTCTACCAAATACCC	CTTCTGAGAGAAGCAACACC	
INRA023	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	TAACACAGGGTGTAGATGAACCTC	Vaiman et al., 1994

центной детекцией Applied Biosystems 3500 (ThermoFisher, США). В качестве референса для аллельного исчисления использовали образцы, валидированные с помощью набора COrDIS Cattle (ООО «Гордиз», Россия).

Статистический анализ данных выполняли с использованием программ GenAlEx v.6.503 (Peakall, Smouse, 2012), Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000), PAST v.4.03 (Hammer et al., 2001) и POPHELPER v1.0.10 (Francis, 2016). Так, программу GenAlEx v.6.503 применяли для оценки генетических дистанций по методу AMOVA (analysis of molecular variance); Structure v.2.3.4 – для расчета критерия Q, который характеризует принадлежность каждой отдельной особи к соответствующему кластеру (субгруппе в пределах группы); веб-приложение POPHELPER v1.0.10 – для графической интерпретации результатов, полученных в Structure v.2.3.4, программу PAST v.4.03 – для построения графика главных компонент на основе расчета генетических дистанций по методу AMOVA.

Результаты и обсуждение

Анализ субпопуляционной структуры исследуемых выборок *B. grunniens* и *B. taurus* с использованием программы Structure v.2.3.4 по данным генотипирования 15 STR-локусов, а также наглядная демонстрация полученного результата, выражающаяся в отнесении особей к конкретной группе и графически представленная в веб-приложении POPHELPER v1.0.10, приведены на рис. 1.

В результате проведенного моделирования (длительность burn-in периода – 5000, количество MCMC (Markov chain Monte Carlo) повторов после burn-in периода – 50000, количество итераций – 10) показано, что имеется четыре четко выраженных кластера ($K = 4$, $\Delta K = 83.2$). В программе Structure v.2.3.4 по методу J.K. Pritchard (Pritchard et al., 2000) для четырех выборок, ABR, HOL, ALA и YAK, также был рассчитан критерий Q, который характеризует принадлежность каждой отдельной особи к

соответствующей группе (виду). В выборке ABR параметр $Q \geq 75\%$ был характерен для 88.9% (40/45) особей, точность классификации 94.4±5.7%; HOL – 82.0% (41/50), точность 95.8±3.3%; ALA – 90.0% (45/50), точность 96.3±4.3%; YAK – 98.2% (54/55), точность 98.3±3.2%. При объединении трех выборок *B. taurus* в одну (COW) и анализе только двух групп – COW и YAK, параметр $Q \geq 75\%$ в первой группе был характерен для 100% (145/145) особей, точность 99.6±0.4%; во второй группе – для 98.2% (54/55), точность 99.2±2.6%.

На основании анализа генетических дистанций, рассчитанных по алгоритму AMOVA, построен график главных компонент (principal component analysis, PCA) (рис. 2). Группы COW и YAK на графике разнесены друг относительно друга и образуют два неперекрывающихся массива.

Из 15 STR-локусов (ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818, CSSM66, ILSTS006, CSRM60), анализируемых в рамках данного исследования, наибольшим потенциалом для решения задачи по дифференциации *B. grunniens* и *B. taurus* обладают те, для которых рассчитанные значения F_{ST} являются максимальными (табл. 2).

Подобный подход, направленный на разработку алгоритма дифференциации эволюционно близких животных с использованием STR-локусов, был описан в работах (Rebała et al., 2016; Nosova et al., 2020).

Набольшие рассчитанные значения F_{ST} показаны для STR-локусов BM1818, BM1824, BM2113, CSSM66 и ILSTS006. Информация об аллельном разнообразии и частоте распространенности аллелей для перечисленных выше STR-локусов представлена в табл. 3.

В результате для групп COW и YAK представленность мажорных аллелей сильно различается. В частности, для BM1818 в группе COW мажорными аллелями являлись

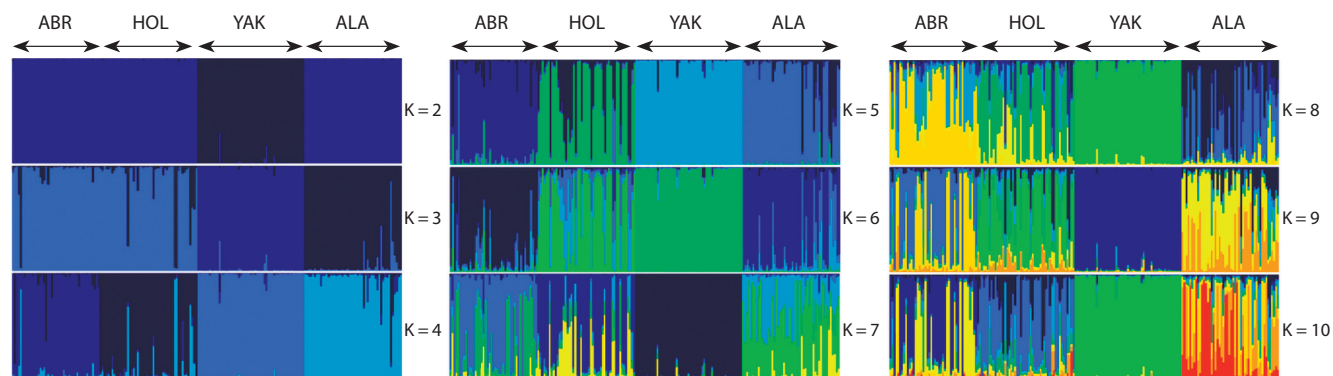


Рис. 1. Результаты анализа генетической структуры исследуемых выборок для наиболее вероятного числа кластеров (K) – от 2 до 10. Выборки: ABR – абердин-ангусская порода; HOL – голштинская; YAK – домашние яки; ALA – алатауская порода.

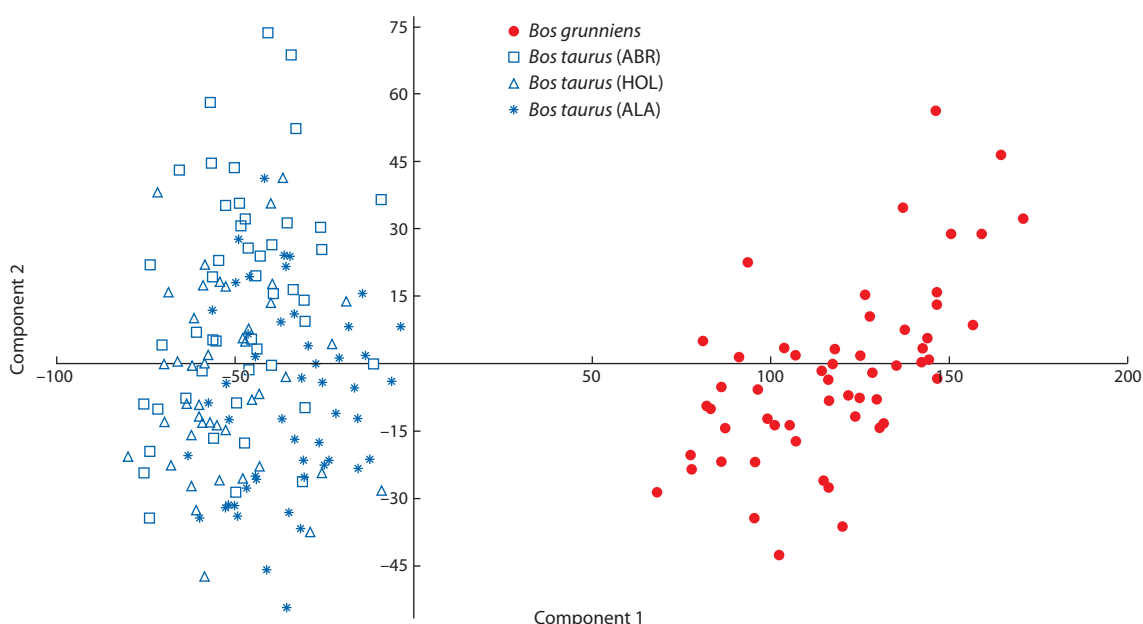


Рис. 2. Результаты анализа главных компонент (по совокупности 15 STR-локусов).

Таблица 2. Дифференцирующий потенциал 15 STR-локусов (результаты анализа locus-by-locus AMOVA для групп COW и YAK)

STR-локус	F_{ST}	p -уровень	STR-локус	F_{ST}	p -уровень	STR-локус	F_{ST}	p -уровень
BM1818	0.056	<0.001	ETH10	0.017	<0.001	SPS115	0.024	<0.001
BM1824	0.041	<0.001	ETH225	0.013	<0.001	TGLA122	0.018	<0.001
BM2113	0.030	<0.001	ETH3	0.028	<0.001	TGLA126	0.017	<0.001
CSRM60	0.018	<0.001	ILSTS006	0.063	<0.001	TGLA227	0.022	<0.001
CSSM66	0.034	<0.001	INRA023	0.023	<0.001	TGLA53	0.029	<0.001

Примечание. Жирным шрифтом выделены максимальные значения F_{ST} .

256, 258 и 262 (суммарная частота распространенности – 84.1 %), для группы YAK мажорный аллель – 262 (встречаемость 56.4 %). Для BM1824 разница в частоте распространенности аллеля 195 в двух группах составила 24.0 % (COW – 18.3 %, YAK – 41.8 %), для аллеля 187 – 22.0 % (COW – 35.2 %, YAK – 12.7 %). Для STR-локуса BM2113 в группе YAK чаще всего встречались аллели

128 (23.6 %) и 130 (27.3 %), тогда как в группе COW суммарная частота этих аллелей составила всего 17.2 %.

Для локуса CSSM66 наблюдается схожая тенденция: имеет место значительное различие по частоте распространенности аллелей 172, 178, 180, 184 и 190. В локусе ILSTS006 для группы YAK наиболее распространенным оказался аллель 294 (42.7 %), для COW – аллели

Таблица 3. Частота распространенности аллелей среди *B. grunniens* и *B. taurus* для пяти STR-локусов с наибольшим дифференцирующим потенциалом (по результатам F_{ST})

Аллель	<i>B. taurus</i>	<i>B. grunniens</i>	Аллель	<i>B. taurus</i>	<i>B. grunniens</i>
BM1818			CSSM66		
250	0.010	–	172	0.134	0.045
254	0.007	0.036	176	0.028	0.118
256	0.303	0.191	178	0.010	0.145
258	0.297	0.091	180	0.169	0.036
260	0.066	0.091	182	0.148	0.227
262	0.241	0.564	184	0.148	0.027
264	0.021	–	186	0.214	0.055
266	0.048	–	190	0.062	0.200
272	0.003	–	192	0.031	–
274	0.003	–	194	0.045	0.091
276	–	0.027	196	0.010	0.045
BM1824			198	–	0.009
185	0.203	0.309	ILSTS006		
187	0.352	0.127	270	0.069	0.018
189	0.155	0.136	272	0.193	0.064
193	0.010	–	274	0.028	0.009
195	0.183	0.418	278	0.055	–
197	0.097	0.009	282	0.010	0.036
BM2113			284	0.003	0.018
124	0.059	–	286	0.114	0.218
128	0.066	0.236	288	0.052	–
130	0.107	0.273	290	0.128	0.182
132	0.003	–	292	0.238	0.009
134	0.166	0.082	294	0.083	0.427
136	0.128	0.064	296	0.028	–
138	0.045	0.127	298	–	0.009
140	0.124	0.027	300	–	0.009
142	0.100	0.009			
144	0.100	0.173			
146	0.034	0.009			
152	0.069	–			

286 (11.4 %), 290 (12.8 %), 272 (19.3 %) и 292 (23.8 %). Информация о частных аллелях для этих STR-локусов отражена в табл. 4.

На основании полученных результатов был проведен повторный анализ субпопуляционной структуры исследуемых групп с использованием программы Structure v.2.3.4 по данным генотипирования только пяти из 15 STR-локусов (табл. 5). Информация об аллельном разнообразии и частоте распространенности аллелей для этих STR-локусов представлена в табл. 3.

Моделирование в программе Structure v.2.3.4 (длительность burn-in периода – 5000, количество MCMC повторов после burn-in периода – 50 000, количество итераций – 10) показало, что имеются четыре четко выраженных кластера (K = 4, ΔK = 119.7). По методу (Pritchard et al., 2000) в про-

грамме Structure v.2.3.4 для четырех выборок – ABR, HOL, ALA и YAK – был рассчитан также критерий Q, который характеризует принадлежность каждой отдельной особи к соответствующей группе (виду). Параметр Q ≥ 75 % в выборке ABR был характерен для 88.9 % (40/45) особей, точность классификации 92.6 ± 5.8 %; HOL – 68.0 % (34/50), точность 92.4 ± 6.2 %; ALA – 82.0 % (41/50), точность 93.2 ± 5.6 %; YAK – 96.4 % (53/55), точность 97.7 ± 3.4 %. Для улучшения точности дифференциации особей голштинской породы необходимо расширить перечень анализируемых STR-локусов, в первую очередь ETH3, TGLA126 и TGLA122.

В совокупности точность дифференциации с использованием STR-локусов BM1818, BM1824, BM2113, CSSM66 и ILSTS006 в пределах двух групп составила: YAK

Таблица 4. Информация о частных аллелях для групп COW и YAK

Группа	STR-локус	Аллель	Частота	
COW	BM1818	266	0.048	
YAK		276	0.027	
COW		264	0.021	
COW		250	0.010	
COW		272	0.003	
COW		274	0.003	
COW		BM1824	193	0.010
COW			BM2113	152
COW		124		0.059
COW		132		0.003
COW	CSSM66	192		0.031
YAK		198	0.009	
COW	ILSTS006	278	0.055	
COW		288	0.052	
COW		296	0.028	
YAK		298	0.009	
YAK		300	0.009	

(*B. grunniens*) – 98.8 ± 3.4 %, COW (*B. taurus*) – 99.1 ± 1.2 %. Таким образом, точность дифференциации сохраняется даже при анализе только пяти из 15 STR-локусов.

Ранее в ИОГен РАН были исследованы гибриды яка с крупным рогатым скотом и по результатам анализа спектра ISSR (inter simple sequence repeats) в популяциях яка и гибридов F₁ выявлен видоспецифичный для яка паттерн из восьми ISSR-фрагментов (Stolpovsky et al., 2014). Также с использованием микросателлитного анализа изучен аллелофонд яков и их гибридов с *B. taurus*, на основании которого установлено высокое генетическое разнообразие для гибридов F₁ в сравнении с исходными видами (Аль-Кейси, 2011). В нашем исследовании гибридных особей между *B. grunniens* и *B. taurus* не выявлено.

Закключение

В настоящем исследовании оценивался дифференцирующий потенциал 15 STR-локусов (ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, TGLA53, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818, CSSM66, ILSTS006, CSRM60) для решения задачи по дифференциации особей *B. grunniens* и *B. taurus*, а также для выявления гибридных особей между этими видами.

По данным анализа субпопуляционной структуры исследуемых групп, выполненного нами на основе результатов генотипирования по 15 STR-локусам, точность классификации особей *B. grunniens* составила 99.1 ± 1.2 %, а особей *B. taurus* – 99.6 ± 0.4 %. При генотипировании только пяти STR-локусов (BM1818, BM1824, BM2113, CSSM66, ILSTS006), дифференцирующий потенциал

Таблица 5. Дифференцирующий потенциал пяти STR-локусов (результаты анализа locus-by-locus AMOVA)

STR-локус	YAK/COW		YAK/ABR/HOL/ALA	
	F _{ST}	p-уровень	F _{ST}	p-уровень
BM1818	0.056	<0.001	0.207	<0.001
BM1824	0.041	<0.001	0.158	<0.001
BM2113	0.030	<0.001	0.130	<0.001
CSSM66	0.034	<0.001	0.113	<0.001
ILSTS006	0.063	<0.001	0.188	<0.001

которых по данным F_{ST} был наибольшим и варьировал в пределах 0.030–0.063, точность классификации для *B. grunniens* составила 98.8 ± 3.4 %, для *B. taurus* – 99.1 ± 1.2 %.

Таким образом, анализ даже небольшого количества STR-локусов позволяет решать задачу по дифференциации домашнего яка и особей трех пород крупного рогатого скота (абердин-ангусская, голштинская и алатауская), разводимых в Кыргызстане. В то же время актуализация оценки точности дифференциации может потребовать проведения аналогичных исследований в среднесрочной перспективе.

Список литературы / References

- Абдыкеримов А. Теория и практика разведения яков в Кыргызстане. Бишкек, 2001.
[Abdykerimov A. Theory and Practice of Raising Yaks in Kyrgyzstan. Bishkek, 2001. (in Russian)]
- Аль-Кейси Т.В. Сравнительное исследование аллелофонда яков и их гибридов с крупным рогатым скотом с использованием микросателлитов: Дис. ... канд. биол. наук. Дубровицы, 2011.
[Al-Kaisy T.V. Comparative study of the allele pool of yaks and their hybrids with cattle using microsatellites. Cand. Biol. Sci. Diss. Dubrovitsy, 2011. (in Russian)]
- Домашние животные Монголии. Материалы животноводственного отряда Монгольской экспедиции АН СССР в 1931 г. Под ред. Я.Я. Лус. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1936.
[Luz Ya.Ya. (Ed.) Domestic Animals of Mongolia. Proceedings of the livestock detachment of the Mongolian expedition of the Academy of Sciences of the USSR in 1931. Moscow–Leningrad: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1936. (in Russian)]
- Черткиев Ш.Ч., Чортонбаев Т.Дж. Научные основы формирования мясной продуктивности яков в онтогенезе. Бишкек, 2007.
[Chertkiev Sh.Ch., Chortonbaev T.J. Scientific Basis for the Formation of Meat Productivity of Yaks in Ontogeny. Bishkek, 2007. (in Russian)]
- Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., Kirkpatrick B.W., Ryan A.M., Clayton D., Li L., Neiberghs H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A., Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E., Hetzel D.J.S. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.* 1994;6(3):227-235. DOI 10.1038/ng0394-227.
- Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Toldo S.S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J., Beattie C.W. A genetic linkage map for cattle. *Genetics.* 1994;136(2):619-639. DOI 10.1093/genetics/136.2.619.
- Bovine Genome Project. Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center. Genome Bovine Whole Genome Assembly release Btau_3.1. URL: <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/> (Application 25.07.2022).

- Brezinsky L., Kemp S.J., Teale A.J. ILSTS006: a polymorphic bovine microsatellite. *Anim. Genet.* 1993;24(1):73. DOI 10.1111/j.1365-2052.1993.tb00933.x.
- Francis R.M. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualise population structure. *Mol. Ecol. Resour.* 2016;17(1):27-32. DOI 10.1111/1755-0998.12509.
- Georges M., Massey J. Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent application WO PUBL NO 92/13102. World Intellectual Property Organization. Geneva, 1992.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):4.
- Jacques G., d'Alpoim Guedes J., Zhang S. Yak domestication: a review of linguistic, archaeological, and genetic evidence. *Ethnobiol. Lett.* 2021;12(1):103-114. DOI 10.14237/ebi.12.1.2021.1755.
- Nosova A.Yu., Kipen V.N., Tsar A.I., Lemesh V.A. Differentiation of hybrid progeny of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and bighead carp (*H. nobilis* Rich.) based on microsatellite polymorphism. *Russ. J. Genet.* 2020;56(3):317-323. DOI 10.1134/S1022795420030126.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.* 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959. DOI 10.1093/genetics/155.2.945.
- Rębała K., Rabsava A.A., Kotova S.A., Kipen V.N., Zhurina N.V., Gandzha A.I., Tsybovsky I.S. STR profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166563. DOI 10.1371/journal.pone.0166563.
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Steffen P., Eggen A., Dietz A.B., Womack J.E., Stranzinger G., Fries R. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet.* 1993;24(2):121-124. DOI 10.1111/j.1365-2052.1993.tb00252.x.
- Stolpovsky Yu.A., Kol N.V., Evsyukov A.N., Nesteruk L.V., Dorzhu Ch.M., Tsendsuren Ts., Sulimova G.E. Comparative analysis of ISSR marker polymorphism in population of yak (*Bos mutus*) and in F₁ hybrids between yak and cattle in the Sayan-Altai region. *Russ. J. Genet.* 2014;50(10):1163-1176. DOI 10.1134/S1022795414100135.
- Toldo S., Fries R., Steffen P., Neiberghs H.L., Barendse W., Womack J.E., Hetzel D.J., Stranzinger G. Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mamm. Genome.* 1993;4(12):720-727. DOI 10.1007/BF00357796.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Leveziel H., Guerin G. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genome.* 1994;5(5):288-297. DOI 10.1007/BF00389543.

ORCID ID

K.B. Chekirov orcid.org/0000-0001-6146-6750
Zh.T. Isakova orcid.org/0000-0002-3681-6939
V.N. Kipen orcid.org/0000-0002-7822-0746
M.I. Irsaliev orcid.org/0000-0002-8364-8982

S.B. Mukeeva orcid.org/0000-0001-9584-4860
K.A. Aitbaev orcid.org/0000-0003-4973-039X
G.A. Sharshenalieva orcid.org/0000-0002-5016-2492
S.B. Beyshenalieva orcid.org/0000-0003-4461-6993
B.U. Kydyralieva orcid.org/0000-0001-9392-2773

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Кыргызской Республики (договор № 30-21 от 15.02.2021 № 129/1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.08.2022. После доработки 06.02.2023. Принята к публикации 24.03.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Количественные параметры генома человека при старении

В.П. Волобаев¹ , С.С. Кунижева^{1, 2, 3}, Л.И. Уральский^{1, 2}, Д.А. Куприянова¹, Е.И. Рогаев^{1, 2, 3, 4}

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, отдел геномики и генетики человека, Москва, Россия

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

⁴ Медицинская школа Чан Массачусетского университета, отделение психиатрии, Шрусбери, США

 volobaev.vp@gmail.com

Аннотация. Здоровое долголетие человека – глобальная цель мировой системы здравоохранения. В то же время неуклонное старение населения стало серьезным вызовом для систем здравоохранения многих стран мира, в том числе из-за возросшего риска развития многих тяжелых нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП). Определение причин и процессов, влияющих на старение и продолжительность жизни человека, а также выявление механизмов развития возрастных патологий – первоочередная фундаментальная задача, стоящая перед научным сообществом. В настоящее время основные усилия направлены на идентификацию качественных характеристик генома, детерминирующих признаков. Вместе с тем при их оценке существует множество проблем, затрудняющих установление ассоциаций. Количественные признаки обременены такими проблемами в меньшем объеме, но в большинстве случаев упускаются при проведении современных геномных исследований, посвященных вопросам старения и долголетия. Несмотря на наличие широкого круга возможностей проведения анализа геномных данных по количественным признакам, большинство возможностей не используется, что наряду с недоступностью опубликованных данных ведет к потере этой важной информации. Настоящий обзор посвящен описанию количественных признаков, важных для понимания процесса старения и необходимых для анализа в дальнейших геномных исследованиях, и является рекомендацией для включения описанных признаков в анализ. Рассматривается взаимосвязь количественных характеристик ядерного и митохондриального генома со старением, долголетием и возрастными нейродегенеративными заболеваниями, таких как частота обширных делеций митохондриальной ДНК (mtDNA), время полураспада mtDNA, частота замен A>G в тяжелой цепи mtDNA, количество копий mtDNA, длина теломер, частота соматических мутаций. В целом можно отметить, что есть достаточно серьезные причины полагать, что различные количественные характеристики генома могут быть прямо или косвенно ассоциированы с теми или иными аспектами старения и продолжительности жизни. Но имеющихся данных недостаточно для окончательных выводов и выявления причинно-следственных связей.

Ключевые слова: количественные параметры генома; старение; долголетие; нейродегенеративные заболевания; mtDNA; длина теломер; соматические мутации.

Для цитирования: Волобаев В.П., Кунижева С.С., Уральский Л.И., Куприянова Д.А., Рогаев Е.И. Количественные параметры генома человека при старении. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):495-501. DOI 10.18699/VJGB-23-60

Quantifying human genome parameters in aging


V.P. Volobaev¹ , S.S. Kunizheva^{1, 2, 3}, L.I. Uralsky^{1, 2}, D.A. Kupriyanova¹, E.I. Rogayev^{1, 2, 3, 4}

¹ Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sochi, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Department of Genomics and Human Genetics, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Center for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology, Moscow, Russia

⁴ University of Massachusetts Chan Medical School, Department of Psychiatry, Shrewsbury, USA

 volobaev.vp@gmail.com

Abstract. Healthy human longevity is a global goal of the world health system. Determining the causes and processes influencing human longevity is the primary fundamental goal facing the scientific community. Currently, the main efforts of the scientific community are aimed at identifying the qualitative characteristics of the genome that determine the trait. At the same time, when evaluating qualitative characteristics, there are many challenges that make it difficult to establish associations. Quantitative traits are burdened with such problems to a lesser extent, but they are largely overlooked in current genomic studies of aging and longevity. Although there is a wide repertoire of quantitative trait analyses based on genomic data, most opportunities are ignored by authors, which, along with the inaccessibility of published data, leads to the loss of this important information. This review focuses on describing quantitative traits important for understanding aging and necessary for analysis in further genomic studies, and recommends the inclusion of the described traits in the analysis. The review considers the relationship between quantitative characteristics of the mitochondrial genome and aging, longevity, and age-related neurodegenerative diseases, such as the frequency of

extensive mitochondrial DNA (mtDNA) deletions, mtDNA half-life, the frequency of A>G replacements in the mtDNA heavy chain, the number of mtDNA copies; special attention is paid to the mtDNA methylation sign. A separate section of this review is devoted to the correlation of telomere length parameters with age, as well as the association of telomere length with the amount of mitochondrial DNA. In addition, we consider such a quantitative feature as the rate of accumulation of somatic mutations with aging in relation to the lifespan of living organisms. In general, it may be noted that there are quite serious reasons to suppose that various quantitative characteristics of the genome may be directly or indirectly associated with certain aspects of aging and longevity. At the same time, the available data are clearly insufficient for definitive conclusions and the determination of causal relationships.

Key words: genome quantification; aging; longevity; neurodegenerative disorders; mtDNA; telomere length; somatic mutations.

For citation: Volobaev V.P., Kunizheva S.S., Uralsky L.I., Kupriyanova D.A., Rogaeв E.I. Quantifying human genome parameters in aging. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):495-501. DOI 10.18699/VJGB-23-60

Введение

Долголетие человека – это труднопрогнозируемый признак. Влиять на него могут факторы окружающей среды, образ жизни, случайные события и индивидуальные генетические особенности. Вклад генетического фактора в развитие фенотипа долголетия доказывают исследования, показавшие значительно большие шансы на долголетие у лиц из семей долгожителей (van den Berg, 2020). Определение конкретных генетических детерминант, связанных с долголетием, существенно затруднено. В настоящее время на различных выборках и разными исследовательскими группами доказано значение для долголетия человека только двух генов, *APOE* и *FOXO3A* (Deelen et al., 2019). Данные для иных генов отличаются для разных выборок, что, вероятно, связано как с популяционными различиями, так и с эффектом множественного сравнения.

Важнейшим фактором, определяющим долголетие, является состояние здоровья организма. Старение мозга с возможным развитием цереброваскулярных и нейродегенеративных патологических процессов – основная причина инвалидности и смерти пожилых людей (Debette et al., 2019). Возраст-ассоциированные заболевания головного мозга, как и сам признак старения, характеризуются сложностью генетической детерминации и противоречивостью опубликованной информации. В отличие от качественных характеристик генома, количественные параметры, такие как длина теломер, количество копий митохондриального ДНК, частота гетерозиготных вариантов митохондриального ДНК, частота соматических мутаций и т. д., в меньшей степени подвержены влиянию популяционных и статистических факторов. В то же время, несмотря на их очевидную важность, таким событиям уделяется мало внимания при изучении генетических основ долголетия. Это наряду с противоречивостью имеющихся данных актуализирует проведение новых исследований.

Цель настоящего обзора – анализ существующей информации о количественных генетических особенностях, влияющих на старение и продолжительность жизни человека.

Количественные характеристики изменений в структуре mtDNA в связи со старением

В последние годы возник большой интерес к роли mtDNA как фактора, определяющего процессы старения и продолжительности жизни ассоциированного с возрастом заболевания. Митохондриальную дисфункцию рассматри-

вают как один из ключевых биомаркеров старения (Miwa et al., 2022), а изменение количественных и качественных характеристик mtDNA непосредственно связывают с продолжительностью жизни. Ввиду пространственной близости с электрон-транспортной цепью mtDNA подвергается повреждающему воздействию свободных радикалов, что наряду с ограниченной способностью к репарации из-за того что mtDNA не защищена гистонами и значительную часть времени при репликации находится в одноцепочечной форме определяет уязвимость структуры mtDNA к повреждению и распаду. Все это опосредует то, что количество химических модификаций и скорость накопления мутаций в mtDNA значительно выше, чем в ДНК ядра клетки.

Повреждение и делетирование участков mtDNA могут вызывать дисфункцию митохондрий в связи с увеличением доли молекул, содержащих обширную делецию (mtDNA_{del}), так как mtDNA с обширной делецией обладает репликативным преимуществом перед mtDNA дикого типа (Kowald, Kirkwood, 2018). Репликативное преимущество, вероятно, определяется меньшим размером реплицируемой молекулы, что приводит к более высокой скорости ее репликации (Diaz, 2002) и в то же время к пониженным шансам повреждения молекулы активными формами кислорода, а значит менее активной митофагией органелл, обогащенных mtDNA_{del}, по сравнению с нормальными органоидами (de Grey, 1997). Причем если в активно пролиферирующих тканях клетки, содержащие дисфункциональные митохондрии, подлежат элиминации и замещению, то ткани, характеризующиеся высоким числом постмитотических клеток, накапливают бремя таких мутаций, что, вероятно, приводит к снижению функциональных параметров ткани (Herbst et al., 2017).

Показано, что доля mtDNA_{del} в мышечной ткани увеличивается с 50 по до 86 лет примерно в 19 раз – с 0.008 до 0.15 % (Herbst et al., 2021b), схожее явление обнаружено и в нервной ткани (Nido et al., 2018). Отмечено также, что значительное накопление mtDNA_{del} наблюдается у пациентов с болезнью Паркинсона в нейронах черной субстанции (Bender et al., 2006; Grünwald et al., 2016) и полосатого тела (Ikebe et al., 1990). Существует также мнение, что накопление mtDNA_{del} в дофаминергических нейронах может запускать нейропротекторные механизмы (Perier et al., 2013).

Состояние неоднородности mtDNA, при котором в митохондриях существует несколько клонов mtDNA, имею-

щих различие в последовательности нуклеотидов, называется гетероплазмией. Известно, что гетероплазмия может возникать как *de novo* во время онтогенеза, так и путем наследования по материнской линии (Sallevelt et al., 2017). Гетероплазмии, по-видимому, могут быть ассоциированы со старением макроорганизма (Just et al., 2015). К примеру, в работе R. Zhang с коллегами отмечено, что в среднем у лиц в возрасте старше 70 лет число гетероплазий mtDNA составило на 58.5 % больше, чем у лиц моложе 40 лет (Zhang et al., 2017). Этот факт приобретает большую значимость, если учитывать, что имеются существенные доказательства связи гетероплазмии mtDNA с нейродегенеративными заболеваниями, непосредственно ассоциированными с продолжительностью жизни: БА (Tranah et al., 2012) и БП (Hudson et al., 2013). В то же время существуют сообщения, показывающие положительную роль гетероплазмии для долголетия (Rose et al., 2010; Sondheimer et al., 2011), что, вероятно, объясняется тем, что гетероплазмия mtDNA представляет собой резервуар генетической изменчивости, которая может привести к новым функциям и увеличить способность клеток справляться с экологическими и физиологическими стрессовыми факторами в течение жизни. Можно предположить, что имеют место оба эти явления и их значение для долголетия определяется локализацией накопления соматических мутаций mtDNA, а также тем, что положительным влиянием могут в большей степени обладать врожденные гетероплазмии, а приобретенные имеют значительные шансы нести негативные свойства.

Еще одним митохондриальным маркером, вероятно, ассоциированным с продолжительностью жизни, может быть частота накопления митохондриальных соматических мутаций mtDNA (mtSNV) A>G в тяжелой цепи mtDNA. В недавнем исследовании (Mikhailova et al., 2022) определена положительная корреляция частоты замен $A_H > G_H$ (H – тяжелая цепь) с продолжительностью жизни разных видов млекопитающих: чем более долгоживущим является вид, тем большая частота $A_H > G_H$ замен у него наблюдается. В то же время авторы предполагают, что такое накопление нуклеотидов G_H произошло в результате оксидативного мутагенеза и представляет собой следствие, а не причину процессов старения.

Время полураспада mtDNA – также, по-видимому, важный фактор, определяющий скорость наступления дисфункции ткани. Предполагается, что продолжительность жизни клеток зависит от времени полураспада mtDNA (Poovathingal et al., 2012; Chan et al., 2013). При проведении моделирования влияния времени полураспада на период выживания клеток определено, что умеренное увеличение периода полураспада mtDNA оказывает глубокое влияние на увеличение времени выживания клеток, тем самым снижая репликативное преимущество mtDNA с обширной делецией (Holt, Davies, 2021). Не менее важно то, что уменьшение периода полураспада mtDNA существенно влияет на процесс накопления mtSNV в тканях, характеризующихся высоким числом постмитотических клеток. Показано, что если период полураспада равняется трем месяцам, то патогенные mtSNV, приобретенные в клетке-предшественнике нейрона на ранней стадии развития и присутствующие в постмито-

тической популяции нейронов со средней частотой 1 %, к 70 годам жизни человека в большинстве нейронов будут содержаться с частотой ~14 % (Li et al., 2019). Соответственно, изменение скорости полураспада в меньшую сторону приводит к сдерживанию митохондриальной гетероплазмии и наоборот.

Помимо мутационных событий, важный количественный признак – число копий mtDNA (mtDNA_{сн}). Изменение mtDNA_{сн} обычно служит отражением реакции митохондрий на окислительный стресс, а также общей дисфункции. В различных исследованиях получены результаты, свидетельствующие о снижении mtDNA_{сн} по мере старения человека (Herbst et al., 2017, 2021a). Обнаружено, что снижение количества копий mtDNA в цельной крови происходит с возрастом, а более низкое число копий mtDNA сопряжено с ухудшением состояния здоровья (Lee et al., 2010; Mengel-From et al., 2014). Высокий уровень mtDNA_{сн}, вероятно, в целом связан с лучшим состоянием здоровья у лиц старшего возраста, включая более высокий уровень когнитивной функции, и сниженной смертностью (Kim et al., 2013; Mengel-From et al., 2014). Снижение показателя mtDNA_{сн} значительно ассоциировано с риском развития возрастных нейродегенеративных заболеваний, таких как деменция, БП, БА и др. (Yang et al., 2021).

Следует отметить, что выявлены как системные тенденции к снижению показателя mtDNA_{сн} у лиц с БА, так и локальное снижение mtDNA_{сн} на 30–50 % в лобной доле коры больших полушарий и гиппокампа по сравнению со здоровым контролем (Coskun et al., 2004; Rice et al., 2014). В то же время описано повышение mtDNA_{сн} у пациентов африканского происхождения с болезнью Паркинсона (Müller-Nedebock et al., 2022).

В исследованиях при изучении изменения mtDNA_{сн} в лейкоцитах крови долгожителей как модели здорового старения получены противоречивые результаты. Y.H. He с коллегами (2014) показали значительное увеличение количества mtDNA_{сн} у столетних людей по сравнению с пожилыми, но в исследовании N. van Leeuwen с коллегами (2014) не наблюдали таковой закономерности, что, возможно, связано с различными методическими подходами. Нужно заметить, что в разных тканях может быть различная возрастная динамика mtDNA_{сн}, к примеру, если в образцах скелетной мускулатуры отмечена обратная корреляция, то в образцах печени или черной субстанции – наоборот, положительная корреляция (Dölle et al., 2016; Wachsmuth et al., 2016).

Показатель mtDNA_{сн}, по-видимому, связан с параметром длины теломер (TL) (Qiu et al., 2015; Tyrka et al., 2015; Dolcini et al., 2020). Предполагается, что данная взаимосвязь базируется на отрицательной корреляции уровня mtDNA_{сн} и уровня активных форм кислорода (ROS) и дальнейшего негативного воздействия ROS на длину теломер (Melicher et al., 2018).

Длина теломер как причина или следствие долголетия

Длина теломер – хорошо известный биомаркер старения (Sanders, Newman, 2013). Хотя в модельных клеточных культурах связь между TL и старением культуры неоспорима (Victorelli, Passos, 2017), в случае многоклеточных

организмов выводы не столь однозначны (Blackburn et al., 2015). Предполагается, что динамика укорочения теломер, а не общая длина теломер, может служить количественным биомаркером продолжительности жизни макроорганизмов (Vera et al., 2012). Например, в перекрестных исследованиях на пяти видах птиц показано, что короткоживущие виды птиц с возрастом теряют больше теломерных повторов, чем виды с большей продолжительностью жизни (Hausmann et al., 2003). Аналогичная корреляция наблюдается у млекопитающих, это позволяет высказать предположение, что долгоживущие животные обладают эффективными механизмами защиты от репликативного старения, такими как более высокая активность теломеразы на протяжении всей жизни (Hausmann et al., 2007).

У человека короткая длина теломер связана с высокой смертностью от различных возрастных патологий, в том числе некоторых нейродегенеративных заболеваний, таких как деменция (Levstek et al., 2021). Однако сообщения о роли длины TL для риска развития БА неоднозначны. Существуют работы, в которых показано, что у людей с БА длина TL ниже, чем в контрольных выборках (Thomas et al., 2008; Forero et al., 2016), в то же время P. Thomas с коллегами отметили, что в некоторых тканях, таких как гиппокамп, наблюдается обратная зависимость. Что примечательно, прослеживается негативное влияние более длинных теломер на динамику и тяжесть заболевания (Movérare-Skrtic et al., 2012; Mahoney et al., 2019). Особо интересно то, что короткая TL является хорошим прогностическим маркером для определения риска развития БА в долгосрочной перспективе у индивидов, не несущих APOE ε4 (Hackenhaar et al., 2021). Более того, TL связана с когнитивной функцией как у престарелых людей, так и у лиц среднего возраста (Hägg et al., 2017; Gamrawar et al., 2022).

Подсчитано, что теломеры лейкоцитов у взрослых людей укорачиваются со средней скоростью 24.7 п. н. в год (Müezziner et al., 2013). На TL и скорость истощения теломер может влиять ряд различных факторов. Например, показано, что TL выше у пожилых женщин, по сравнению с мужчинами (Benetos et al., 2001) и у афроамериканцев, по сравнению с европеоидами (Hunt et al., 2008). Кроме того, надо отметить, что, помимо большого количества исследований, в которых обнаружены отрицательная корреляция TL с возрастом и ассоциация данного параметра со смертностью в старшей возрастной группе, существуют работы, в которых данные закономерности не подтверждены (Sanders, Newman, 2013).

Изначально предполагалось, что подобное несоответствие связано с особенностями проведения конкретных исследований, таких как методология формирования выборок, наличие стратификации популяционных групп, тип изучаемой ткани и методы изучения показателя. Так, например, в обширном исследовании TL в различных тканях определено, что в 21-м типе ткани наблюдается отрицательная корреляция TL с возрастом (наиболее сильные корреляции для цельной крови и желудочной ткани), в то время как для тканей семенников, яичников, мозжечка, влагаллица, скелетных мышц, щитовидной железы и гастроэзофагеального соединения корреляции не найдено (Demanelis et al., 2020).

При изучении долгожителей в качестве модели здорового старения была выдвинута гипотеза, что TL в первую очередь зависит от физиологического состояния организма, а не от возраста. Показано, что у «высокоэффективных» (с малым количеством заболеваний и высокой физической активностью) долгожителей TL значимо превышала TL у «малоэффективных» (высокое количество заболеваний и низкая физическая активность). В связи с чем было сделано предположение, что, вероятно, не фактор длины теломер влияет на способность дожить до 100 лет, а состояние здоровья, ассоциированное с длиной теломер (Terry et al., 2008; Tedone et al., 2019). В пользу этой теории также свидетельствует исследование TL у однополых близнецов старше 70 лет, в котором выявлена четкая связь между TL лейкоцитов крови и физическим здоровьем, в том числе между близнецами (Bendix et al., 2011). Таким образом, изучение динамики теломер у долгожителей имеет особое значение, поскольку у них могут быть выработаны механизмы, которые активно откладывают старение и обеспечивают эффективную защиту от негативных последствий процессов старения.

Соматические мутации и их роль в долголетию

Современная теория старения предполагает, что накопление мутаций ДНК в соматических клетках (copy number variations, CNV) с возрастом приводит к снижению клеточной функции за счет инактивации или нарушения работы важных генов (Kennedy et al., 2012). Действительно, показано, что с возрастом происходит накопление соматических мутаций, причем с дифференцированной скоростью для различных тканей. Так, например, в базальных клетках проксимальных бронхов человека скорость накопления мутаций составляет ~29 CNV на клетку в год (copy number variations per cell per year, CNVs/pcpy) (Huang et al., 2022), в нейронах префронтальной коры и гиппокампа 16–21 CNVs/pcpy (Lodato et al., 2018; Miller et al., 2022), в подкожных преадипоцитах – 18 CNVs/pcpy, преадипоцитах висцеральной жировой ткани – 27 CNVs/pcpy (Franco et al., 2019), в T-клетках памяти ~25 CNVs/pcpy, в наивных B-лимфоцитах ~15 CNVs/pcpy, в гемопоэтических стволовых клетках и клетках-предшественниках ~16 CNVs/pcpy (Machado et al., 2022), в сперматогониях ~2 CNVs/pcpy (Milholland et al., 2017).

Яркой иллюстрацией значения CNV для продолжительности жизни являются исследования скорости накопления мутаций в криптах толстого кишечника у млекопитающих с разной продолжительностью жизни (Cagan et al., 2022). Если для человека показатель равнялся ~47 CNVs/pcpy, то для жирафов при продолжительности жизни 25–35 лет ~99 CNVs/pcpy, хорьков при продолжительности жизни 14 лет ~496 CNVs/pcpy, мышей при продолжительности жизни два года ~796 CNVs/pcpy. То есть хорошо прослеживается зависимость продолжительности жизни и скорости накопления мутаций.

В то же время отмечено, что частота соматических мутаций у человека в старости намного ниже, чем требуется для потери функции гена в значительном количестве клеток, что свидетельствует о косвенной связи между показателями (Vijg, Dong, 2020). При изучении большой выборки китайских долгожителей, по сравнению с

контрольной, обнаружено, что в выборке долгожителей уровень CNV был значительно выше, чем в контрольной выборке. Это подтверждает то, что частота CNV прямо не влияет на вероятность превышения популяционной нормы продолжительности жизни (Zhao et al., 2018). С другой стороны, при исследовании столетних долгожителей из Италии получены другие данные: у долгожителей уровень CNV был значительно ниже, чем в контрольной группе (Garagnani et al., 2021). С учетом противоречивых результатов, полученных в этих двух исследованиях, необходимо проведение дополнительных изысканий по этому вопросу.

Заключение

Таким образом, существуют основания предполагать наличие значительной связи между динамикой старения, продолжительностью жизни, здоровым старением, риском развития нейродегенеративных заболеваний и различными количественными характеристиками генома. В то же время в большинстве случаев не определено, что является причиной, а что – следствием. Это наряду с единичным характером имеющихся публикаций актуализирует проведение дополнительных исследований.

Список литературы / References

- Bender A., Krishnan K.J., Morris C.M., Taylor G.A., Reeve A.K., Perry R.H., Jaros E., Hersheson J.S., Betts J., Klopstock T., Taylor R.W., Turnbull D.M. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* 2006;38(5):515-517. DOI 10.1038/ng1769.
- Bendix L., Gade M.M., Staun P.W., Kimura M., Jeune B., Hjelmborg J.V.B., Aviv A., Christensen K. Leukocyte telomere length and physical ability among Danish Twins age 70+. *Mech. Ageing Dev.* 2011;132(11-12):568-572. DOI 10.1016/j.mad.2011.10.003.
- Benetos A., Okuda K., Lajemi M., Kimura M., Thomas F., Skurnick J., Labat C., Bean K., Aviv A. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension.* 2001;37(2):381-385. DOI 10.1161/01.hyp.37.2.381.
- Blackburn E.H., Epel E.S., Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science.* 2015;350(6265):1193-1198. DOI 10.1126/science.aab3389.
- Cagan A., Baez-Ortega A., Brzozowska N., Abascal F., Coorens T.H.H., Sanders M.A., Lawson A.R.J., ... Bochynska D., Smith E.St.J., Gerstung M., Campbell P.J., Murchison E.P., Stratton M.R., Martincorena I. Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature.* 2022;604(7906):517-524. DOI 10.1038/s41586-022-04618-z.
- Chan S.W., Chevalier S., Aprikian A., Chen J.Z. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood: a sensitive approach to systemic oxidative stress. *BioMed Res. Int.* 2013;2013:157547. DOI 10.1155/2013/157547.
- Coskun P.E., Beal M.F., Wallace D.C. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(29):10726-10731. DOI 10.1073/pnas.0403649101.
- Debette S., Schilling S., Duperron M., Larsson S.C., Markus H.S. Clinical significance of magnetic resonance imaging markers of vascular brain injury: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2019;76(1):81-94. DOI 10.1001/jamaneurol.2018.3122.
- Deelen J., Evans D.S., Arking D.E., Tesi N., Nygaard M., Liu X., Wojczynski M.K., ... Zeng Y., Zheng W., Holstege H., Kiel D.P., Lunetta K.L., Slagboom P.E., Murabito J.M. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies multiple longevity genes. *Nat. Commun.* 2019;10(1):3669. DOI 10.1038/s41467-019-11558-2.
- de Grey A.D.N.J. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *BioEssays.* 1997;19(2):161-166. DOI 10.1002/bies.950190211.
- Demanelis K., Jasmine F., Chen L.S., Chernoff M., Tong L., Delgado D., Zhang C., Shinkle J., Sabarinathan M., Lin H., Ramirez E., Oliva M., Kim-Hellmuth S., Stranger B.E., Lai T.-P., Aviv A., Ardlie K.G., Aguet F., Ahsan H., Doherty J.A., Kibriya M.G., Pierce B.L. Determinants of telomere length across human tissues. *Science.* 2020;369(6509):eaaaz6876. DOI 10.1126/science.aaz6876.
- Diaz F. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(21):4626-4633. DOI 10.1093/nar/gkf602.
- Dolcini J., Wu H., Nwanaji-Enwerem J.C., Kiomourtozlogu M.A., Cayir A., Sanchez-Guerra M., Vokonas P., Schwarz J., Baccarelli A.A. Mitochondria and aging in older individuals: an analysis of DNA methylation age metrics, leukocyte telomere length, and mitochondrial DNA copy number in the VA normative aging study. *Ageing.* 2020;12(3):2070-2083. DOI 10.18632/ageing.102722.
- Dölle C., Flønes I., Nido G.S., Miletic H., Osuagwu N., Kristoffersen S., Lilleng P.K., Larsen J.P., Tysnes O.B., Haugarvoll K., Bindoff L.A., Tzoulis C. Defective mitochondrial DNA homeostasis in the substantia nigra in Parkinson disease. *Nat. Commun.* 2016;22(7):13548. DOI 10.1038/ncomms13548.
- Forero D.A., González-Giraldo Y., López-Quintero C., Castro-Vega L.J., Barreto G.E., Perry G. Meta-analysis of telomere length in Alzheimer's disease. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2016;71(8): 1069-1073. DOI 10.1093/gerona/glw053.
- Franco I., Helgadottir H.T., Moggio A., Larsson M., Vrtačnik P., Johansson A., Norgren N., Lundin P., Mas-Ponte D., Nordström J., Lundgren T., Stenvinkel P., Wennberg L., Supek F., Eriksson M. Whole genome DNA sequencing provides an atlas of somatic mutagenesis in healthy human cells and identifies a tumor-prone cell type. *Genome Biol.* 2019;20(1):285. DOI 10.1186/s13059-019-1892-z.
- Gampawar P., Schmidt R., Schmidt H. Telomere length and brain aging: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* 2022;80:101679. DOI 10.1016/j.arr.2022.101679.
- Garagnani P., Marquis J., Delledonne M., Pirazzini C., Marasco E., Kwiatkowska K.M., Iannuzzi V., ... Bertamini L., Martinelli N., Girelli D., Olivieri O., Giuliani C., Descombes P., Franceschi C. Whole-genome sequencing analysis of semi-supercentenarians. *eLife.* 2021;10:e57849. DOI 10.7554/eLife.57849.
- Grünewald A., Rygiel K.A., Hepplewhite P.D., Morris C.M., Picard M., Turnbull D.M. Mitochondrial DNA depletion in respiratory chain-deficient Parkinson disease neurons. *Ann. Neurol.* 2016;79(3):366-378. DOI 10.1002/ana.24571.
- Hackenhaar F.S., Josefsson M., Adolfsson A.N., Landfors M., Kauppi K., Hultdin M., Adolfsson R., Degerman S., Pudas S. Short leukocyte telomeres predict 25-year Alzheimer's disease incidence in non-APOE ε4-carriers. *Alzheimers Res. Ther.* 2021;13(1):130. DOI 10.1186/s13195-021-00871-y.
- Hausmann M.F., Winkler D.W., O'Reilly K.M., Huntington C.E., Nisbet I.C., Vleck C.M. Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proc. Biol. Sci.* 2003; 270(1522):1387-1392. DOI 10.1098/rspb.2003.2385.
- Hausmann M.F., Winkler D.W., Huntington C.E., Nisbet I.C., Vleck C.M. Telomerase activity is maintained throughout the lifespan of long-lived birds. *Exp. Gerontol.* 2007;42(7):610-618. DOI 10.1016/j.exger.2007.03.004.
- Hägg S., Zhan Y., Karlsson R., Gerritsen L., Ploner A., van der Lee S.J., Broer L., ... Kuh D., Starr J.M., Deary I.J., Slagboom P.E., van Duijn C.M., Codd V., Pedersen N.L. Short telomere length is associated with impaired cognitive performance in European ancestry cohorts. *Transl. Psychiatry.* 2017;7(4):e1100. DOI 10.1038/tp.2017.73.
- He Y.H., Lu X., Wu H., Cai W.W., Yang L.Q., Xu L.Y., Sun H.P., Kong Q.P. Mitochondrial DNA content contributes to healthy aging

- in Chinese: a study from nonagenarians and centenarians. *Neurobiol. Aging*. 2014;35(7):1779.e1-1779.e4. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.015.
- Herbst A., Widjaja K., Nguy B., Lushaj E.B., Moore T.M., Hevener A.L., McKenzie D., Aiken J.M., Wanagat J. Digital PCR quantitation of muscle mitochondrial DNA: age, fiber type, and mutation-induced changes. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2017;72(10):1327-1333. DOI 10.1093/gerona/glx058.
- Herbst A., Lee C.C., Vandiver A.R., Aiken J.M., McKenzie D., Hoang A., Allison D., Liu N., Wanagat J. Mitochondrial DNA deletion mutations increase exponentially with age in human skeletal muscle. *Aging Clin. Exp. Res.* 2021a;33(7):1811-1820. DOI 10.1007/s40520-020-01698-7.
- Herbst A., Prior S.J., Lee C.C., Aiken J.M., McKenzie D., Hoang A., Liu N., Chen X., Xun P., Allison D.B., Wanagat J. Skeletal muscle mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion mutation frequency as predictors of physical performance in older men and women. *Geroscience*. 2021b;43(3):1253-1264. DOI 10.1007/s11357-021-00351-z.
- Holt A.G., Davies A.M. The effect of mitochondrial DNA half-life on deletion mutation proliferation in long lived cells. *Acta Biotheor.* 2021;69(4):671-695. DOI 10.1007/s10441-021-09417-z.
- Huang Z., Sun S., Lee M., Maslov A.Y., Shi M., Waldman S., Marsh A., Siddiqui T., Dong X., Peter Y., Sadoughi A., Shah C., Ye K., Spivack S.D., Vijg J. Single-cell analysis of somatic mutations in human bronchial epithelial cells in relation to aging and smoking. *Nat. Genet.* 2022;54(4):492-498. DOI 10.1038/s41588-022-01035-w.
- Hudson G., Nalls M., Evans J.R., Breen D.P., Winder-Rhodes S., Morrison K.E., Morris H.R., Williams-Gray C.H., Barker R.A., Singleton A.B., Hardy J., Wood N.E., Burn D.J., Chinnery P.F. Two-stage association study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in Parkinson disease. *Neurology*. 2013;80(22):2042-2048. DOI 10.1212/WNL.0b013e318294b434.
- Hunt S.C., Chen W., Gardner J.P., Kimura M., Srinivasan S.R., Eckfeldt J.H., Berenson G.S., Aviv A. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell*. 2008;7(4):451-458. DOI 10.1111/j.1474-9726.2008.00397.x.
- Ikebe S., Tanaka M., Ohno K., Sato W., Hattori K., Kondo T., Mizuno Y., Ozawa T. Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;170(3):1044-1048. DOI 10.1016/0006-291x(90)90497-b.
- Just R.S., Irwin J.A., Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015;18:131-139. DOI 10.1016/j.fsigen.2015.05.003.
- Kennedy S.R., Loeb L.A., Herr A.J. Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mech. Ageing Dev.* 2012;133(4):118-126. DOI 10.1016/j.mad.2011.10.009.
- Kim J.-H., Kim H.K., Ko J.-H., Bang H., Lee D.-C. The relationship between leukocyte mitochondrial DNA copy number and telomere length in community-dwelling elderly women. *PLoS One*. 2013;8(6):e67227. DOI 10.1371/journal.pone.0067227.
- Kowald A., Kirkwood T. Resolving the enigma of the clonal expansion of mtDNA deletions. *Genes (Basel)*. 2018;9(3):126. DOI 10.3390/genes9030126.
- Lee J.W., Park K.D., Im J.A., Kim M.Y., Lee D.C. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood is associated with cognitive function in apparently healthy elderly women. *Clin. Chim. Acta*. 2010;411(7-8):592-596. DOI 10.1016/j.cca.2010.01.024.
- Levstek T., Redenšek S., Trošt M., Dolžan V., Podkrajšek K.T. Assessment of the telomere length and its effect on the symptomatology of Parkinson's disease. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(1):137. DOI 10.3390/antiox10010137.
- Li H., Slone J., Fei L., Huang T. Mitochondrial DNA variants and common diseases: A mathematical model for the diversity of age-related mtDNA mutations. *Cells*. 2019;8(6):608. DOI 10.3390/cells8060608.
- Lodato M.A., Rodin R.E., Bohrsen C.L., Coulter M.E., Barton A.R., Kwon M., Sherman M.A., Vitzthum C.M., Luquette L.J., Yandava C.N., Yang P., Chittenden T.W., Hatem N.E., Ryu S.C., Woodworth M.B., Park P.J., Walsh C.A. Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*. 2018;359(6375):555-559. DOI 10.1126/science.aao4426.
- Machado H.E., Mitchell E., Øbro N.F., Kübler K., Davies M., Leon-gamornlert D., Cull A., Maura F., Sanders M.A., Cagan A.T.J., McDonald C., Belmonte M., Shepherd M.S., Vieira Braga F.A., Osborne R.J., Mahbubani K., Martincorena I., Laurenti E., Green A.R., Getz G., Polak P., Saeb-Parsy K., Hodson D.J., Kent D.G., Campbell P.J. Diverse mutational landscapes in human lymphocytes. *Nature*. 2022;608(7924):724-732. DOI 10.1038/s41586-022-05072-7.
- Mahoney E.R., Dumitrescu L., Seto M., Nudelman K.N.H., Buckley R.F., Gifford K.A., Saykin A.J., Jefferson A.J., Hohman T.J. Telomere length associations with cognition depend on Alzheimer's disease biomarkers. *Alzheimers Dement. (NY)*. 2019;5:883-890. DOI 10.1016/j.trci.2019.11.003.
- Melicher D., Illés A., Pállinger É., Kovács Á.F., Littvay L., Tárnoki Á.D., Tárnoki D.L., Bikov A., Molnár M.J., Buzás E.I., Falus A. Tight co-twin similarity of monozygotic twins for hTERT protein level of T cell subsets, for telomere length and mitochondrial DNA copy number, but not for telomerase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018;75(13):2447-2456. DOI 10.1007/s00018-017-2738-z.
- Mengel-From J., Thinggaard M., Dalgård C., Kyvik K.O., Christensen K., Christiansen L. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum. Genet.* 2014;133(9):1149-1159. DOI 10.1007/s00439-014-1458-9.
- Mikhailova A.G., Mikhailova A.A., Ushakova K., Tretiakov E.O., Iliushchenko D., Shamansky V., Lobanova V., Kozenkov I., Efimenko B., Yurchenko A.A., Kozenkova E., Zdobnov E.M., Makeev V., Yurov V., Tanaka M., Gostimskaya I., Fleischmann Z., Annis S., Franco M., Wasko K., Denisov S., Kunz W.S., Knorre D., Mazunin I., Nikolaev S., Fellay J., Reymond A., Khrapko K., Gunbin K., Popadin K. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(18):10264-10277. DOI 10.1093/nar/gkac779.
- Milholland B., Dong X., Zhang L., Hao X., Suh Y., Vijg J. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. *Nat. Commun.* 2017;8(1):15183. DOI 10.1038/ncomms15183.
- Miller M.B., Huang A.Y., Kim J., Zhou Z., Kirkham S.L., Maury E.A., Ziegenfuss J.S., Reed H.C., Neil J.E., Rento L., Ryu S.C., Ma C.C., Luquette L.J., Ames H.M., Oakley D.H., Frosch M.P., Hyman B.T., Lodato M.A., Lee E.A., Walsh C.A. Somatic genomic changes in single Alzheimer's disease neurons. *Nature*. 2022;604(7907):714-722. DOI 10.1038/s41586-022-04640-1.
- Miwa S., Kashyap S., Chini E., von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J. Clin. Invest.* 2022;132(13):e158447. DOI 10.1172/JCI158447.
- Movérare-Skrct S., Johansson P., Mattsson N., Hansson O., Wallin A., Johansson J.O., Zetterberg H., Blennow K., Svensson J. Leukocyte telomere length (LTL) is reduced in stable mild cognitive impairment but low LTL is not associated with conversion to Alzheimer's disease: a pilot study. *Exp. Gerontol.* 2012;47(2):179-182. DOI 10.1016/j.exger.2011.12.005.
- Müezzinzler A., Zaineddin A.K., Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res. Rev.* 2013;12:509-519. DOI 10.1016/j.arr.2013.01.003.
- Müller-Nedebock A.C., Meldau S., Lombard C., Abrahams S., van der Westhuizen F.H., Bardien S. Increased blood-derived mitochondrial DNA copy number in African ancestry individuals with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2022;101:1-5. DOI 10.1016/j.parkreldis.2022.06.003.
- Nido G.S., Dölle C., Flønes I., Tuppen H.A., Alves G., Tysnes O.-B., Haugarvöll K., Tzoulis C. Ultradeep mapping of neuronal mitochondrial deletions in Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*. 2018;63:120-127. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.024.

- Perier C., Bender A., García-Arumí E., Melià M.J., Bové J., Laub C., Klopstock T., Elstner M., Mounsey R.B., Teismann P., Prolla T., Andreu A.L., Vila M. Accumulation of mitochondrial DNA deletions within dopaminergic neurons triggers neuroprotective mechanisms. *Brain*. 2013;136(Pt. 8):2369-2378. DOI 10.1093/brain/awt196.
- Poovathingal S.K., Gruber J., Lakshmanan L., Halliwell B., Gunawan R. Is mitochondrial DNA turnover slower than commonly assumed? *Biogerontology*. 2012;13(5):557-564. DOI 10.1007/s10522-012-9390-7.
- Qiu C., Enquobahrie D., Gelaye B., Hevner K., Williams M. The association between leukocyte telomere length and mitochondrial DNA copy number in pregnant women: A pilot study. *Clin. Lab.* 2015; 61(3-4):363-369. DOI 10.7754/Clin.Lab.2014.140313.
- Rice A.C., Keeney P.M., Algarzae N.K., Ladd A.C., Thomas R.R., Bennett J.P. Jr. Mitochondrial DNA copy numbers in pyramidal neurons are decreased and mitochondrial biogenesis transcriptome signaling is disrupted in Alzheimer's disease hippocampi. *J. Alzheimer's Dis.* 2014;40(2):319-330. DOI 10.3233/JAD-131715.
- Rose G., Romeo G., Dato S., Crocco P., Bruni A.C., Hervonen A., Majamaa K., Sevinci F., Franceschi C., Passarino G. Somatic point mutations in mtDNA control region are influenced by genetic background and associated with healthy aging: A GEHA study. *PLoS One*. 2010;5(10):e13395. DOI 10.1371/journal.pone.0013395.
- Sallevelt S.C., de Die-Smulders C.E., Hendrickx A.T., Hellebrekers D.M., de Coo I.F., Alston C.L., Knowles C., Taylor R.W., McFarland R., Smeets H.J. De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk. *J. Med. Genet.* 2017;54(2):73-83. DOI 10.1136/jmedgenet-2016-103876.
- Sanders J.L., Newman A.B. Telomere length in epidemiology: A biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol. Rev.* 2013;35(1):112-131. DOI 10.1093/epirev/mxs008.
- Sondheimer N., Glatz C.E., Tirone J.E., Deardorff M.A., Krieger A.M., Hakonarson H. Neutral mitochondrial heteroplasmy and the influence of aging. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20(8):1653-1659. DOI 10.1093/hmg/ddr043.
- Tedone E., Huang E., O'Hara R., Batten K., Ludlow A.T., Lai T.-P., Arosio B., Mari D., Wright W.E., Shay J.W. Telomere length and telomerase activity in T cells are biomarkers of high-performing centenarians. *Aging Cell*. 2019;18(1):e12859. DOI 10.1111/ace1.12859.
- Terry D.F., Nolan V.G., Andersen S.L., Perls T.T., Cawthon R. Association of longer telomeres with better health in centenarians. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008;63(8):809-812. DOI 10.1093/gerona/63.8.809.
- Thomas P., O'Callaghan N.J., Fenech M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2008;129(4):183-190. DOI 10.1016/j.mad.2007.12.004.
- Tranah G.J., Nalls M.A., Katzman S.M., Yokoyama J.S., Lam E.T., Zhao Y., Mooney S., Thomas F., Newman A.B., Liu Y., Cummings S.R., Harris T.B., Yaffe K. Mitochondrial DNA sequence variation associated with dementia and cognitive function in the elderly. *J. Alzheimers. Dis.* 2012;32(2):357-372. DOI 10.3233/JAD-2012-120466.
- Tyrka A.R., Carpenter L.L., Kao H.-T., Porton B., Philip N.S., Ridout S.J., Ridout K.K., Price L.H. Association of telomere length and mitochondrial DNA copy number in a community sample of healthy adults. *Exp. Gerontol.* 2015;66:17-20. DOI 10.1016/j.exger.2015.04.002.
- van den Berg N. Family matters in unraveling human longevity. *Aging*. 2020;12(22):22354-22355. DOI 10.18632/aging.104218.
- van Leeuwen N., Beekman M., Deelen J., van den Akker E.B., de Craen A.J.M., Slagboom P.E., 't Hart L.M. Low mitochondrial DNA content associates with familial longevity: the Leiden Longevity Study. *Age (Dordr.)*. 2014;36(3):9629. DOI 10.1007/s11357-014-9629-0.
- Vera E., Bernardes de Jesus B., Foronda M., Flores J.M., Blasco M.A. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep.* 2012;2(4):732-737. DOI 10.1016/j.celrep.2012.08.023.
- Victorelli S., Passos J.F. Telomeres and cell senescence – size matters not. *EBioMedicine*. 2017;21:14-20. DOI 10.1016/j.ebiom.2017.03.027.
- Vijg J., Dong X. Pathogenic mechanisms of somatic mutation and genome mosaicism in aging. *Cell*. 2020;182(1):12-23. DOI 10.1016/j.cell.2020.06.024.
- Wachsmuth M., Hübner A., Li M., Madea B., Stoneking M. Age-related and heteroplasmy-related variation in human mtDNA copy number. *PLoS Genet.* 2016;12(3):e1005939. DOI 10.1371/journal.pgen.1005939.
- Yang S.Y., Castellani C.A., Longchamps R.J., Pillalamarri V.K., O'Rourke B., Guallar E., Arking D.E. Blood-derived mitochondrial DNA copy number is associated with gene expression across multiple tissues and is predictive for incident neurodegenerative disease. *Genome Res.* 2021;31(3):349-358. DOI 10.1101/gr.269381.120.
- Zhang R., Wang Y., Ye K., Picard M., Gu Z. Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics*. 2017;18(1):890. DOI 10.1186/s12864-017-4287-0.
- Zhao X., Liu X., Zhang A., Chen H., Huo Q., Li W., Ye R., Chen Z., Liang L., Liu Q.A., Shen J., Jin X., Li W., Nygaard M., Liu X., Hou Y., Ni T., Bolund L., Gottschalk W., Tao W., Gu J., Tian X.L., Yang H., Wang J., Xu X., Lutz M.W., Min J., Zeng Y., Nie C. The correlation of copy number variations with longevity in a genome-wide association study of Han Chinese. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10(6):1206-1222. DOI 10.18632/aging.101461.

ORCID ID

V.P. Volobaev orcid.org/0000-0001-7355-9882
S.S. Kunizheva orcid.org/0000-0003-1882-0667
L.I. Uralsky orcid.org/0000-0002-5565-7961
D.A. Kupriyanova orcid.org/0009-0002-2228-6276
E.I. Rogaev orcid.org/0000-0002-0351-8783

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 19-75-30039 (Р.Е.И., К.С.С., У.Л.И.) и научно-технологического университета «Сириус» в рамках научного проекта GEN-RND-2019 (В.В.П., К.Д.А.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.11.2022. После доработки 07.02.2023. Принята к публикации 07.02.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Мозаичная потеря Y-хромосомы при нейродегенеративных и онкологических заболеваниях человека

И.Л. Кузнецова^{1, 2}✉, Л.И. Уральский^{1, 2}, Т.В. Тяжелова¹, Т.В. Андреева^{1, 2, 3}, Е.И. Робаев^{1, 2, 3}

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, отдел геномики и генетики человека, Москва, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи, Россия

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

✉ irakuzn@gmail.com

Аннотация. Одно из наиболее актуальных направлений современной генетики и геномики человека – разработка новых биомаркеров для прогнозирования и раннего выявления заболеваний человека, а также для мониторинга ответа на терапию. До недавнего времени считалось, что функция генов Y-хромосомы человека ограничена определением пола и контролем сперматогенеза. Благодаря созданию крупных баз данных, полученных на основе метода поиска ассоциаций (GWAS), произошел переход к использованию больших выборок при анализе генетических изменений в норме и при патологиях, в том числе стало возможно оценить связь мозаичной анеуплоидии по Y-хромосоме в соматических клетках с более короткой продолжительностью жизни у мужчин по сравнению с женщинами. На основе данных Британского биобанка (UK Biobank) была обнаружена ассоциация между мозаичной потерей Y-хромосомы (mLOY) в лейкоцитах периферической крови с возрастом мужчин старше 70 лет, а также с рядом онкологических, сердечных, метаболических, нейродегенеративных и психических заболеваний. В результате mLOY в клетках периферической крови стала рассматриваться в качестве потенциального маркера биологического возраста мужчин и как маркер определенных возрастных болезней. На сегодняшний день определено множество ассоциаций между mLOY и генами, выявленными на основании данных GWAS и транскриптомов в пораженных тканях, однако не установлены ни точная причина возникновения mLOY, ни влияние и последствия этого феномена на уровне всего организма. В частности, неясно, влияет ли анеуплоидия по Y-хромосоме в клетках крови на развитие патологий, проявляющихся в других органах, например на мозг при болезни Альцгеймера, или представляет собой нейтральный биомаркер общей геномной нестабильности. В обзоре рассмотрены основные патологии и генетические факторы, ассоциированные с mLOY, и гипотезы их взаимосвязи. Особое внимание уделено последним исследованиям, посвященным mLOY в клетках мозга при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: мозаичная потеря Y-хромосомы (mLOY); болезнь Альцгеймера; GWAS; возрастные заболевания; онкологические заболевания.

Для цитирования: Кузнецова И.Л., Уральский Л.И., Тяжелова Т.В., Андреева Т.В., Робаев Е.И. Мозаичная потеря Y-хромосомы при нейродегенеративных и онкологических заболеваниях человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):502-511. DOI 10.18699/VJGB-23-61

Mosaic loss of the Y chromosome in human neurodegenerative and oncological diseases

I.L. Kuznetsova^{1, 2}✉, L.I. Uralsky^{1, 2}, T.V. Tyazhelova¹, T.V. Andreeva^{1, 2, 3}, E.I. Rogaev^{1, 2, 3}

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Department of Genomics and Human Genetics, Moscow, Russia

² Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sochi, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Center for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology, Moscow, Russia

✉ irakuzn@gmail.com

Abstract. The development of new biomarkers for prediction and early detection of human diseases, as well as for monitoring the response to therapy is one of the most relevant areas of modern human genetics and genomics. Until recently, it was believed that the function of human Y chromosome genes was limited to determining sex and controlling spermatogenesis. Thanks to occurrence of large databases of the genome-wide association study (GWAS), there has been a transition to the use of large samples for analyzing genetic changes in both normal and pathological conditions. This has made it possible to assess the association of mosaic aneuploidy of the Y chromosome in somatic cells with a shorter lifespan in men compared to women. Based on data from the UK Biobank, an association was found between mosaic loss of the Y chromosome (mLOY) in peripheral blood leukocytes and the age of men over 70, as well as a number of oncological, cardiac, metabolic, neurodegenerative, and psychiatric diseases. As a result, mLOY in peripheral blood cells has been considered a potential marker of biological age in men and as a marker of certain age-related diseases. Currently, numerous associations have been identified between mLOY and genes based on GWAS and transcriptomes in affected tissues. However, the exact cause of mLOY and the impact and consequences of this

phenomenon at the whole organism level have not been established. In particular, it is unclear whether aneuploidy of the Y chromosome in blood cells may affect the development of pathologies that manifest in other organs, such as the brain in Alzheimer's disease, or whether it is a neutral biomarker of general genomic instability. This review examines the main pathologies and genetic factors associated with mLOY, as well as the hypotheses regarding their interplay. Special attention is given to recent studies on mLOY in brain cells in Alzheimer's disease.

Key words: mosaic loss of Y chromosome (mLOY); Alzheimer's disease; GWAS; age-related diseases; oncological diseases.

For citation: Kuznetsova I.L., Uralsky L.I., Tyazhelova T.V., Andreeva T.V., Rogaev E.I. Mosaic loss of the Y chromosome in human neurodegenerative and oncological diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):502-511. DOI 10.18699/VJGB-23-61

Введение

Анеуплоидия по Y-хромосоме в соматических клетках, возникающая с возрастом, впервые была выявлена 50 лет назад с помощью кариотипирования клеток крови (Jacobs et al., 1963) и отнесена к обычному возрастному феномену накопления постзиготических генетических aberrаций как половых хромосом, так и аутосом, не связанных с заболеваниями (Pierre, Hoagland, 1972). Несколько позже было проведено кариотипирование клеток костного мозга у больных мужчин с острым миелоидным лейкозом, миелодиспластическим синдромом (МДС), миелопролиферативным заболеванием (МПЗ) и здоровых доноров, для того чтобы оценить вклад LOY (потеря Y-хромосомы) в злокачественность заболевания (Pierre, Hoagland, 1972; Loss of the Y chromosome..., 1992).

Несмотря на то что анеуплоидия характерна для многих видов опухолей, частота встречаемости и уровень mLOY как у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, так и у здоровых доноров зависят от возраста мужчины, а не от злокачественности заболевания, и поэтому mLOY не может рассматриваться как маркер злокачественного клона. Вследствие этого в течение нескольких десятилетий ученые не относили mLOY к разряду жизненно важных факторов, в том числе исходя из факта, что женщины жизнеспособны без Y-хромосомы.

Позже гипотеза об отсутствии связи mLOY с заболеваниями была опровергнута в ряде работ, в которых использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Установлено, что частота встречаемости mLOY повышена в различных солидных опухолях (van Dekken et al., 1990; Sandberg, 1992; König et al., 1994; Takahashi et al., 1994), при аутоиммунном тиреоидите, онкогематологических заболеваниях (Persani et al., 2012) и первичном билиарном циррозе (Lleo et al., 2013). В последние годы с появлением методов секвенирования нового поколения и крупных баз данных GWAS с подробным клиническим описанием доноров, включая базу данных Британского биобанка, стало возможно с высокой точностью статистически оценить частоту mLOY. Выявлено, что у 40 % мужчин старше 70 лет Y-хромосома отсутствует в более 5 % периферических иммунных клеток крови, а также что mLOY в периферической крови связана с повышенным риском смертности от всех причин (Thompson et al., 2019).

За последнее десятилетие были обнаружены устойчивые ассоциации между mLOY в крови и разнообразными возрастными заболеваниями, включая гематологические (Forsberg et al., 2014; Cáceres et al., 2020) и негематологические виды рака (Forsberg et al., 2012, 2014; Cáceres et al., 2020), при которых частота mLOY варьирует от 15

до 80 % (Zhang et al., 2007; Bianchi, 2009; Silva Veiga et al., 2012; Duijff et al., 2013), дегенерацию желтого пятна (Forsberg et al., 2014; Cáceres et al., 2020; Duan et al., 2022), сердечно-сосудистые заболевания (Sano et al., 2022) и нейродегенеративные заболевания (Dumanski et al., 2016; Vermeulen et al., 2022). Дополнительно было установлено влияние таких внешних факторов, как курение и загрязнение окружающей среды, на уровень mLOY в клетках крови (Dumanski et al., 2015; Qin et al., 2019).

На основании этих результатов выдвинуто предположение, что биологическое значение Y-хромосомы выходит за рамки определения пола и сперматогенеза, и она может участвовать патологических процессах, молекулярно-биологическую основу которых еще предстоит изучить. Наибольшее количество исследований mLOY при патологиях связано с онкологическими заболеваниями и болезнью Альцгеймера, которые мы рассмотрим подробнее.

Патологии, связанные с mLOY

LOY в клетках солидных опухолей

Мозаичная потеря Y-хромосомы (mLOY) была зарегистрирована методом FISH в опухолях различных типов рака желудка, где встречаемость варьировала от 61 до 69 % (Hunter et al., 1993; Beuzen et al., 2000), в 33–36 % случаев новообразований поджелудочной железы (Chia-Hsien Cheng et al., 2001; Kowalski et al., 2007), 23–34 % случаев рака мочевого пузыря (Sauter et al., 1995; Minner et al., 2010) и в 12.7 % рака груди у мужчин (Agahozo et al., 2020). Достаточно хорошо изучены с помощью метода FISH mLOY при различных типах почечно-клеточного рака, где встречаемость LOY варьирует от 77 % при папиллярном почечно-клеточном раке до 39 % при наиболее распространенном типе – светлоклеточном почечно-клеточном раке (Büscheck et al., 2021).

В частности, было выдвинуто предположение, что aberrации Y-хромосомы могут быть причиной более частого возникновения светлоклеточного почечно-клеточного рака у мужчин по сравнению с женщинами. Действительно, помимо ранее известных вариаций числа копий в аутосомах, связанных с этим заболеванием, с помощью анализа полногеномных данных и мультиплексной ПЦР показано, что у более чем 30 % пациентов мужского пола обнаруживается LOY в опухолевых клетках (Arseneault et al., 2017). Удивительно, но в опухолевых образцах рака предстательной железы встречаемость LOY оказалась очень низкой. Так, на выборке, состоящей из 2053 образцов от пациентов, подвергшихся простатэктомии, только в 12 выявлена анеуплоидия по Y-хромосоме (Stahl et al.,

2012). Такая низкая частота встречаемости может объясняться тем, что mLOY отображает общую хромосомную нестабильность опухолевых клеток, которая в случае рака простаты ниже относительно многих других типов рака (de Matos et al., 2019).

В связи с распространенностью LOY в крови было ожидаемо выявить повышенную частоту встречаемости LOY в образцах костного мозга у пациентов с различными гематологическими нарушениями. При исследовании 237 образцов от пациентов – больных с МПЗ, МДС, острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), хроническим миелоидным лейкозом, множественной миеломой и лимфомой, LOY была обнаружена только в 10 % случаев (Zhang et al., 2007).

К сожалению, прогностический потенциал LOY в опухолях до конца неясен. При раке шеи и головы LOY в клетках опухоли может быть индикатором резистентности к терапии (Hollows et al., 2019). В случае инвазивных уротелиальных раков LOY в опухолях не была связана с выживаемостью, повышенным риском рецидивов или повышенным риском прогрессирования (Minner et al., 2010). Например, в случае рака простаты не обнаружено значимых ассоциаций между потерей Y-хромосомы в клетках опухоли и возрастом пациента, стадией развития опухоли и риском ее рецидива, но значительно связано с высоким уровнем Глисона и, соответственно, с плохим прогнозом исхода заболевания (Stahl et al., 2012).

Таким образом, отсутствие Y-хромосомы является распространенным событием для опухолей, но отличается в частоте встречаемости для разных типов рака; и пока накоплено недостаточно данных для детального понимания причин таких отличий. Другими словами, наличие и уровень mLOY в опухоли еще нельзя рассматривать как маркер злокачественности или считать важной информацией для прогноза лечения и рецидива.

mLOY в периферической крови при гематологических и негематологических онкозаболеваниях

Исследование крупной когорты на основе базы данных Упсальского лонгитюдного исследования взрослых мужчин (ULSAM) показало, что мужчины с mLOY в крови имели повышенный риск диагностики рака и смертности от различных негематологических видов рака (Forsberg et al., 2014). Проведен анализ, включающий данные для всех случаев солидных опухолей, представленных в Британском биобанке, результаты которого подтвердили связь частоты встречаемости mLOY и наличия опухоли (Loftfield et al., 2019). Ассоциация mLOY в крови с риском развития рака в других органах описана в нескольких независимых исследованиях на меньших выборках, например, повышенная частота mLOY, по сравнению с возрастной нормой, была показана для рака простаты и колоректального рака (Noveski et al., 2016).

Потеря Y-хромосомы в лейкоцитах также может выступать как маркер опухолевого клона при гематологических заболеваниях. Например, найдены ассоциации mLOY с прогнозом более тяжелого течения при таких лейкозах, как ОМЛ (Holmes et al., 1985), хронический миелоидный лейкоз (Lippert et al., 2010) и хронический лимфоцитарный лейкоз (Chapiro et al., 2014). Однако в случае МДС, не перешедшего в ОМЛ, наличие mLOY может быть благо-

приятным фактором для выздоровления (García-Isidoro et al., 1997). Еще одно выявленное условие устойчивой ассоциации с МДС и возможностью прогнозирования его течения – наличие mLOY в очень высокой доле (более 75 %) клеток крови (Wiktor et al., 2000; Ouseph et al., 2021).

Попытка сузить область поиска до специфических типов клеток в случае МДС была предпринята в работе (Ganster et al., 2015), где проанализировано соотношение уровня mLOY в клетках CD34+, связанных с МДС, и mLOY – в клетках CD3+, не связанных с МДС. В результате было показано, что уровень mLOY и в CD34+, и в CD3+-клетках зависит от возраста у мужчин без гематологических заболеваний, а в случае клеток CD34+ был значительно выше у пациентов с МДС по сравнению с пожилыми контрольными мужчинами без гематологических патологий. Эти данные свидетельствуют о том, что уровень LOY в крови имеет возрастную основу, но также связан с МДС. Кроме того, чтобы отличить возрастные изменения от повышенной mLOY при МДС, C. Ganster с коллегами (2015) определили границу уровня LOY в CD34+ в периферической крови, составляющую 21.5 %.

Интересные данные на китайской когорте были получены в исследовании mLOY при раке легких, где она является защитным фактором от развития рака легких, но только у некурящих пациентов (Qin et al., 2019). Это единственное сообщение о возможном протективном факторе mLOY, которое сложно интерпретировать.

Дополнительно следует отметить результаты анализа данных из Британского биобанка, противоречащие вышеизложенным, которые привели к выводу, что mLOY прежде всего ассоциирована с возрастом и курением, но не с распространенными видами рака (Zhou et al., 2016). Это заключение было подвергнуто критике, поскольку в выборке были использованы данные не только для лейкоцитов, но и для клеток буккального эпителия (Forsberg et al., 2019). Позже было показано, что при анализе mLOY добавление данных для буккального эпителия нивелирует результат, полученный для mLOY в лейкоцитах (Zhou et al., 2016). Таким образом, несмотря на некоторые разногласия в результатах исследований, можно сделать вывод, что mLOY в крови человека обладает значительным потенциалом в качестве одного из биомаркеров злокачественных заболеваний, особенно при уровне выше 20 %.

Механизм возникновения mLOY

Результаты цитологических исследований указывают на то, что потеря Y-хромосомы в соматических клетках происходит во время деления. Наиболее распространена версия, что mLOY связана с механизмом, включающим формирование микроядра с изолированной Y-хромосомой после неправильной сегрегации хромосом во время митоза с последующим разрушением образовавшегося микроядра путем аутофагии, что приводит к появлению клеток 45,X0 у пожилых мужчин (Guttenbach et al., 1994; Ly et al., 2019; Guo et al., 2020). Возрастные факторы, такие как укорочение теломер и дисфункция центромер, могут усиливать нарушения сегрегации хромосом. По сравнению с мозаичной анеуплоидией по аутосомам и X-хромосоме, mLOY – более частое событие, по-видимому, вследствие ее общего гетерохроматинизированного статуса и небольшого размера

(Clark, 2014; Wright et al., 2017). Кроме того, Y-хромосома человека обогащена повторяющимися последовательностями, которые, возможно, играют роль в нарушении сегрегации во время митоза (Jobling, Tyler-Smith, 2017).

Остается неясным, на какой стадии дифференцировки лейкоцитов человека происходят потеря Y-хромосомы и запуск клонирования клеток с кариотипом 45,X0. Одна из гипотез связана с первичной потерей Y-хромосомы в гематопозитических предшественниках. Этот процесс может быть объединен с клональным гемопоэзом с неопределенным потенциалом (СНП), который определяется как обнаружение соматических мутаций в генах, обычно связанных с миелоидными новообразованиями, в периферической крови индивидов без признаков гематологического злокачественного новообразования. СНП возникает из-за старения гемопоэтических стволовых клеток, которые накопили мутации, приводящие к пролиферативному преимуществу по сравнению со своими сверстниками и, как следствие, к клональной экспансии (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014).

Клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом – возрастной феномен, регулярно наблюдаемый у здоровых пожилых людей с частотой до 10 % в возрасте 70 лет, однако он также связан с повышенным риском гематологических злокачественных новообразований и сердечно-сосудистых заболеваний (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014, 2017). Версия, является ли mLOY одним из проявлений, сопутствующим СНП, рассмотрена в работе (Ljungström et al., 2022), где был проведен анализ частоты мутаций и mLOY в моноцитах мужчин 65–90 лет. Результаты свидетельствуют о частом сосуществовании mLOY и СНП в моноцитах. В другой работе также было показано совместное появление LOY и СНП в клетках костного мозга, полученных от пациентов, направленных на клиническое обследование костного мозга (Ouseph et al., 2021). Надо отметить, что при исследовании моноцитов также обнаружены случаи с LOY без СНП и наоборот. Но размер выборок в этих работах был очень ограничен (24 и 73 участника), и полученный результат требует подтверждения в дальнейших исследованиях. Необходимо принимать во внимание, что СНП наблюдается у 10 %, а mLOY – у 40 % 70-летних мужчин.

Мозаичная потеря Y-хромосомы выделяется среди анеуплоидий в лейкоцитах по остальным хромосомам более высокой частотой встречаемости и, по-видимому, может быть биомаркером общей хромосомной нестабильности, характерной для общего старения организма и для многих заболеваний человека. Однако использование mLOY в диагностических и прогностических целях преждевременно ввиду отсутствия точных механистических данных о природе этого явления. Еще предстоит найти ответ на вопросы: зависит ли наблюдаемый уровень mLOY от событий *de novo* или от высокой клональности, и как оба возможных механизма связаны со стадиями различных заболеваний.

Генетические факторы mLOY

Y-хромосома человека, по последней версии (T2T-CHM13v2.0, далее T2T-Y) сборки генома человека, имеет длину более 62 млн пар оснований (Rhie et al., 2022). Она

состоит из трех основных областей: концы хромосомы содержат псевдоаутосомные области (PAR1 и PAR2), гомологичные концевым участкам X-хромосомы, а оставшаяся часть (около 95 %) представляет собой специфичную мужскую область Y-хромосомы MSY (male-specific region of the Y chromosome), которая не рекомбинирует (Colaco, Modi, 2018), в результате чего в MSY происходит накопление повторяющихся последовательностей.

По версии T2T-Y сборки, Y-хромосома содержит 693 аннотированных гена и 888 транскриптов, из которых 107 (493 транскрипта) – белок-кодирующие. В дополнение к наличию всех генов, аннотированных в GRCh38-Y, сборка T2T-Y содержит 110 собственных генов, среди которых 42 предсказаны как белок-кодирующие. Гены Y постоянно деградируют, что может быть обусловлено отсутствием рекомбинации на этой хромосоме. Наличие большого числа повторов, в свою очередь, способствует хромосомным перестройкам и внутривхромосомной рекомбинации (Jobling, Tyler-Smith, 2003; de Knijff, 2022). С приходом эры GWAS варианты Y-хромосомы, к сожалению, не вошли во множество таких исследований из-за отсутствия рекомбинации и высокого содержания повторов (Хуе, Tyler-Smith, 2017; Parker et al., 2020), вследствие чего Y-хромосома намного хуже охарактеризована в молекулярно-генетическом аспекте по сравнению с остальными хромосомами человека.

Для выявления молекулярно-генетических факторов, лежащих в основе возникновения у определенной доли мужчин mLOY, используются прежде всего данные GWAS для аутосом. Первая обнаруженная генетическая ассоциация с mLOY была связана с однонуклеотидной вариацией rs2887399 вблизи гена *TCL1A* (Zhou et al., 2016). Продукт этого гена, белок TCL1A, участвует в канцерогенезе, в основном за счет хромосомных перестроек (Laine et al., 2000). Сильная ассоциация между rs2887399 и mLOY была воспроизведена в последующих исследованиях на других когортах (Wright et al., 2017; Thompson et al., 2019). Всего на сегодняшний день с использованием данных Британского биобанка стало известно о более чем 150 генетических вариантах в аутосомах, ассоциированных с mLOY (Thompson et al., 2019), среди которых варианты в генах, связанных с общей регуляцией клеточного цикла (*CCND2*, *CCND3*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDK5RAP1*, *ATM*), структурой хроматина при митозе (*NCAPG2*, *SMC2*), структурой и функцией кинетохора и веретена деления (*CENPN*, *CENPU*, *PMF1*, *ZWILCH*, *SPDL1*).

Обнаружены ассоциации с генами восприимчивости к раку, а также с соматическими факторами роста опухоли и мишенями противоопухолевой терапии. К таким генам относятся, например, гены, кодирующие белки, которые участвуют в распознавании реагирования на повреждение ДНК (*SETD2*, *DDB2*, *PARP1*, *ATM*, *TP53* и *CHEK2*) и в апоптотических процессах (*PMAIP1*, *SPOP*, *LTBR*, *SGMS1*, *TP53INP1*, *DAP*, гены семейства BCL-2). Эти ассоциации были подтверждены на японской и европейской популяционных выборках, суммарно содержащих данные для более 750 тыс. мужчин (Thompson et al., 2019), и позже эти варианты были успешно использованы для предсказания mLOY методом оценки полигенного риска (Riaz et al., 2021).

Выявленные генетические вариации в генах, ключевых для клеточного цикла, дают основание предположить, что благодаря им клетки без Y-хромосомы могут избегать молекулярных процессов, которые уничтожают анеуплоидные клетки, в результате чего происходят их пролиферация и накопление в ткани. Тем более в самой Y-хромосоме нет генов, связанных с выживанием соматических клеток или митозом, поэтому ее отсутствие не должно быть связано с ограничениями для деления клетки (Maan et al., 2017). С другой стороны, многие из наиболее часто наблюдаемых мутаций, ассоциированные с LOY, связаны с общей геномной нестабильностью. Действительно, на основании данных GWAS крупного когортного исследования показано, что мозаичность по аутосомным хромосомам чаще встречается у мужчин с LOY (Zhou et al., 2016).

Большинство обнаруженных генетических вариантов, связанных с mLOY, часто расположено вблизи генов, известных как кодирующие факторы роста опухоли, мишени для лечения рака или способствующие восприимчивости к раку. Это одно из объяснений ассоциации mLOY с негематологическими видами рака, причем выявленные локусы ассоциированы не только с различными типами рака мужских органов (рак простаты и герминогенная опухоль яичек), но и с не зависящими от пола типами рака (рак легких, колоректальный рак, глиома и почечно-клеточный рак), а также связаны с повышенным риском развития специфичных для женщин негематологических видов рака (рак молочной железы, яичников и эндометрия) (Thompson et al., 2019). Исходя из этих результатов, можно сделать вывод, что mLOY отражает определенное общее аутосомно-детерминированное состояние организма.

Помимо выяснения первопричины mLOY, задачей генетических исследований этого феномена является установление последствий мозаичного отсутствия всех генов половой хромосомы в лейкоцитах на пожилой мужской организм. Одна из гипотез заключается в том, что можно рассматривать потерю определенных генов в связи с клональным отсутствием Y-хромосомы как причину запуска молекулярно-биологических процессов, ведущих к возрастным патологиям. В частности, можно предположить, что потеря генов в областях PAR1 и PAR2 может повлиять на уровень экспрессии этих генов.

Таким примером является ген *CD99*, расположенный в области PAR1 Y- и X-хромосом, не подлежащий X-инактивации у женщин (Sharp et al., 2011), что может указывать на важность его сбалансированной экспрессии. Ген *CD99*, наиболее высоко экспрессируемый в клетках крови, кодирует трансмембранный гликопротеин CD99, который играет важную роль в функционировании иммунной системы и влияет на ключевые свойства лейкоцитов (Sohn et al., 2001; Schenkel et al., 2002; Brémond et al., 2009; Pasello et al., 2018). Действительно, методом CITESeq, позволяющим, помимо секвенирования РНК, получить информацию о поверхностных белках единичных клеток, установлено пониженное содержание белка CD99 в единичных лейкоцитах без Y-хромосомы, что может указывать на связь LOY с иммунными функциями организма в лейкоцитах, которое зависит от гомологичных участков половых хромосом (Mattisson et al., 2021).

Другой ген Y-хромосомы, который напрямую может влиять на развитие злокачественной опухоли, – *KDM6C*, расположен в MSY-области и кодирует гистоновую деметилазу. Ген *KDM6C* имеет функционально сходный X-сцепленный гомолог *KDM6A*, дефицит которого, в частности, связан с прогрессированием светлоклеточного почечно-клеточного рака (Arseneault et al., 2017). Интерес представляют также гены Y-хромосомы, функционально соответствующие опухолевым супрессорам: *KDM5B* и *KDM5D* (деметилазы гистонов), *DDX3Y* (РНК-геликаза), *EIF1AY* (фактор инициации трансляции), *RPS4Y1* (субъединица рибосомы), *ZFY* (фактор транскрипции) (Dunford et al., 2017; Willis-Owen et al., 2021).

Развитие омиксных исследований дало возможность более детально рассмотреть потенциальные дополнительные функции генов Y-хромосомы. Так, на основании протеомных исследований обнаружено, что ген *DDX3Y*, расположенный в MSY-области Y-хромосомы, может модулировать дифференцировку нейронов (Vakilian et al., 2015), а гаплогруппа Y-хромосомы может быть фактором рака предстательной железы (Cannon-Albright et al., 2014). Установлено, что SRY (область MSY, определяющая пол), возможно, является онкогенным фактором (Murakami et al., 2014), более того, SRY участвует в молекулярно-генетическом пути, связанном с легочной артериальной гипертензией (Yan et al., 2018).

Получены первые свидетельства о возможном влиянии mLOY на экспрессию аутосомных генов. В частности, на основании данных секвенирования транскриптов единичных клеток (scRNAseq) обнаружено повышение экспрессии известного онкогена *TCL1A*. Продукт этого гена, белок TCL1, – стимулятор клеточной пролиферации (Thompson et al., 2019). В опухолях с mLOY наблюдается повышенная экспрессия генов, которые участвуют в резистентности как к лучевой терапии, так и к химиотерапевтическим препаратам на основе цисплатина (Hollows et al., 2019), что отчасти может объяснять связь mLOY с прогнозом лечения.

Таким образом, генетические исследования свидетельствуют о том, что mLOY детерминирован как высокополигенное явление. К сожалению, на основании данных GWAS сложно проследить, влияют ли однонуклеотидные и структурные вариации в самой Y-хромосоме на риск появления mLOY. В частности, для популяционных исследований актуально будет выяснить, как связаны гаплогруппы Y-хромосомы с различными показателями mLOY. Исходя из генетических факторов, установленных в результате поиска ассоциаций, можно сделать вывод, что на mLOY влияют, во-первых, увеличение частоты ошибок во время митоза, а во-вторых, нарушение распознавания хромосомного дисбаланса и ухудшение апоптотической регуляции.

mLOY и болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) – прогрессирующее и необратимое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, ответственное за ~70% всех случаев деменции. В результате генетических исследований найдены мутации в генах *PSEN1*, *PSEN2* и *APP*, которые являются основной причиной семейной БА (Sorbi et al., 1995; Masters et al., 2015). Известно множество вариаций в генах –

факторах риска развития спорадической болезни Альцгеймера. Среди них аллель аполипопротеина E4 (ApoE4) – наибольший генетический фактор риска, при этом гомозиготное носительство ApoE4 в 14 раз увеличивает склонность к развитию БА (Yamazaki et al., 2019). Хотя продолжительность жизни мужчин в среднем меньше, чем у женщин, данное возрастное летальное заболевание у мужчин развивается реже, и поэтому влияние мужской половой хромосомы на патогенез БА было малоожидано. Однако результаты первого исследования «случай-контроль» mLOY у больных БА с использованием базы данных European Alzheimer's Disease Initiative stage 1, ULSAM и Перспективного исследования сосудистой системы у пожилых жителей Уппсалы (PIVUS), показали, что mLOY статистически значимо в среднем в 2.8 раза чаще встречается в лейкоцитах у мужчин с БА по сравнению с контрольной выборкой без патологий мозга (Dumanski et al., 2016). Эти результаты были основаны на анализе данных секвенирования с высоким качеством 606 образцов ДНК крови больных БА и 1005 – контрольной выборки всех возрастов.

Чтобы минимизировать непосредственное влияние на результат фактора возраста как на риск развития БА, так и mLOY, было получено отдельное подтверждение ассоциации БА и mLOY на двух подвыборках с узкими возрастными рамками: мужчин в возрасте 70–75 и 75–80 лет (Dumanski et al., 2016). Обнаруженная ассоциация сохранялась и при учете влияния других возрастных заболеваний (сердечно-сосудистых, диабета), а также вредных привычек (прием алкоголя и курения). Данные лонгитюдных исследований, в которых участники тестировались несколько раз с временным интервалом около 10 лет, позволили оценить, является ли mLOY фактором риска для болезни Альцгеймера. Так, за время наблюдения ULSAM и PIVUS зарегистрировано 140 единичных случаев БА. Результаты анализа данных для этих индивидов, с поправкой на возраст взятия пробы крови и возрастные заболевания, показали, что mLOY – достоверный фактор риска БА, увеличивающий вероятность ее диагноза в 6.8 раза.

Поскольку гаплотип ApoE4 – один из важнейших факторов риска развития БА, а также единственный на сегодняшний день подтвержденный на множестве независимых выборок генетический фактор, влияющий на продолжительность жизни (Nebel et al., 2011), его вклад все чаще оценивают в исследованиях, связанных с возрастными заболеваниями. Известно, что наличие гаплотипа ApoE4 может повлиять на фенотипическое проявление других генетических вариантов (Kuznetsova et al., 2022). В случае mLOY было показано, что, во-первых, гаплотип ApoE2/3/4 не влияет на уровень mLOY в лейкоцитах (Dumanski et al., 2016). Во-вторых, оценка совместного влияния ApoE4 и mLOY дала отрицательный результат, из чего авторы сделали вывод, что риск возникновения БА от этих факторов проявляется независимо.

Однако некоторые исследования приводят к выводу, что возможен интегративный эффект mLOY и генов, связанных с развитием БА. Так, установлено влияние гаплотипа ApoE4 на наличие mLOY в клетках дорсолатеральной префронтальной коры (Graham et al., 2019), а в исследовании нейронов, полученных из индуцированных

плюрипотентных стволовых клеток человека от пациента с семейной БА с мутацией в гене *PSEN1*, продемонстрировано, что LOY усиливает токсические эффекты Aβ42, приводящие к нарушению дифференцировки нейронов и преждевременной гибели клеток (Mendivil-Perez et al., 2019). На японской популяции была показана статистически значимая связь mLOY с вариацией, расположенной вблизи ассоциированного с тяжестью деменции гена *SPON1* (Sherva et al., 2014; Terao et al., 2019).

Попытка ответить на ключевой вопрос, служит ли LOY причиной или следствием возрастных заболеваний, была также предпринята для болезни Альцгеймера. Количественное сравнение частоты LOY показало, что в лейкоцитах процент mLOY выше, чем в нейронах (Graham et al., 2019) и также связан с возрастом мужчины. Исследования на клеточных линиях выявили, что отсутствие Y-хромосомы наблюдается чаще в фибробластах, чем нейроноподобных клетках iPS. Однако, если учитывать, что LOY может зависеть от пролиферативной способности клеток, то микроглия и клетки-предшественники олигодендроцитов могут быть более склонны к накоплению LOY, чем терминально дифференцированные нейрональные клетки.

На основании данных scRNAseq и секвенирования РНК единичных ядер продемонстрировано (Vermeulen et al., 2022) обогащение LOY в микроглии, в отличие от нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, причем в микроглии уровень mLOY был значительно выше у пациентов с болезнью Альцгеймера. При сравнительном анализе микроглии различных отделов головного мозга показано, что в соматосенсорной коре головного мозга мужчин с БА 21 % микроглии был классифицирован как LOY по сравнению с 1.81 % в контроле, тогда как в энторинальной области коры частота LOY составила 32.7 % у больных и 3.27 % в контроле. По мнению авторов, повышенный уровень LOY в энторинальной области коры больных БА представляет особый интерес, поскольку эта часть головного мозга первой поражается при БА (Gómez-Isla et al., 1996; Kobre-Flatmoen et al., 2021).

По результатам нескольких исследований становится все более очевидным, что частота встречаемости mLOY повышена в случае БА и онкологических заболеваний, а также является их риск-фактором (Forsberg et al., 2014; Dumanski et al., 2016; Noveski et al., 2016). Двойственный путь развития определенных триггеров, приводящих либо к раку, либо к БА, отмечен в нескольких работах (Behrens et al., 2009; Lanni et al., 2021). Действительно, показано, что мозаичное отсутствие Y-хромосомы в крови – конкурентный риск-фактор между появлением БА и солидными видами рака (Dumanski et al., 2016).

Таким образом, можно сделать вывод, что mLOY в крови как специфичный для мужчин фактор риска как БА, так и рака может по крайней мере частично объяснить, почему мужчины в среднем живут меньше женщин.

Последние работы позволяют нам сделать первое представление об изменениях в экспрессии генов в клетках мозга при mLOY (Graham et al., 2019). Так, анализ с использованием популяционной выборки дифференциальной экспрессии генов в клетках микроглии с Y-хромосомой и ее отсутствием выявил 193 гена с нарушенной регуляцией

при потере Y-хромосомы (Bellenguez et al., 2022). В этот список входят гены, играющие роль в старении, основных функциях глиомы и воспалении. С помощью пересечения списка аутосомных генов с нарушенной экспрессией, подтвержденной влиянию mLOY в лейкоцитах и микроглии, были найдены гены *TMEM176B*, *S100Z*, *TMEM71*, *CD226*, *B2M*, *SCMH1*, *LITAF* и *IL15*, преимущественно связанные с иммунным ответом и воспалением.

Для генов половых хромосом, расположенных в областях PAR, была установлена связь между mLOY и экспрессией гена *CD99*, ранее выявленная в лейкоцитах, что аргументирует гипотезу о возможном нарушении функционирования иммунной системы, связанном напрямую с отсутствием Y-хромосомы. При mLOY, помимо гена *CD99*, дисрегуляции в микроглии подвергаются гены *GTPBP6*, *IL3RA*, *SLC25A6*, *P2RY8*, *AKAP17A*, *DHRX* и *CSF2RA*, расположенные в области PAR1 Y-хромосомы. В частности, установлено, что ген *CSF2RA*, участвующий в молекулярно-биологическом пути, связанном с нейродегенерацией, в головном мозге экспрессируется только в микроглии и ассоциированных с головным мозгом макрофагах. Поскольку такое исследование проводила только одна группа исследователей, то полученные результаты требуют подтверждения в независимых исследованиях.

Обнаружение связи mLOY в клетках мозга с БА побудило к изучению мозаичной потери Y-хромосомы в случае других психических заболеваний. Получены данные об отсутствии или слабой связи с шизофренией (Hirata et al., 2018), а также данные о выраженной ассоциации mLOY с суицидальными наклонностями, причем в последнем случае уровень mLOY в крови был повышен почти в 3 раза. Интересно отметить, что в дорсолатеральной префронтальной коре постмортального мозга индивидов, закончивших жизнь суицидом, изменений уровня mLOY не обнаружено, однако эти данные имеют ограниченную достоверность в связи с небольшим размером выборки (Kimura et al., 2018).

Заключение

Многочисленные исследования, проведенные в крупных когортах, показали, что содержание LOY в клетках крови является значительным фактором риска смертности и различных заболеваний у мужчин. Исходя из накопленных данных об ассоциациях mLOY с различными патологиями, становится все более вероятным, что анализ LOY может стать чувствительным биомаркером для БА, солидных опухолей и онкогематологических заболеваний, а также общей геномной нестабильности. Однако следует учитывать, что на сегодняшний день ни в одном исследовании не представлено прямых доказательных фактов, как именно возникает, как воздействует и какие последствия вызывает mLOY. С точки зрения предиктивного потенциала необходимо понимание, служит ли мозаичное отсутствие Y-хромосомы барометром, отражающим наличие патологий, или, наоборот, mLOY возникает *de novo* и участвует в патогенезе. В связи с этим предстоит ответить на целый ряд вопросов, например: если LOY имеет патогенный эффект, то проявляется ли он в нетрансформированных клетках крови или в перерожденных клонах в случае онкогематологических заболеваний?

Другой вопрос, требующий решения, заключается в том, как LOY в нормальных клетках крови может быть связана с патологическими процессами в других органах, приводящими к опухолям в других органах или к нейродегенерации в мозге. На сегодняшний день наиболее привлекательна гипотеза иммунного надзора, объясняющая механизмы, лежащие в основе ассоциаций между LOY в клетках крови и усиленной неопластической пролиферацией клеток в опухоли в другой части организма или возникновением болезни Альцгеймера.

Сравнение данных для mLOY в разных популяциях является сложным из-за малого количества таких исследований на сегодняшний день и различий в методиках. Большинство полученных данных этнически ограничено и может не подтвердиться на мало представленных в базах данных популяциях, например африканских или ближневосточных. На основании двух исследований, сделанных в одной и той же научной группе, можно предварительно заключить, что встречаемость mLOY у мужчин в европейских популяциях выше, чем в африканской популяции (Loftfield et al., 2018, 2019). Однако необходимо отметить, что пока такое сравнение единично.

Несмотря на множество вопросов, которые в связи с популярностью темы, скорее всего, будут активно решаться, уже сейчас можно заключить, что mLOY играет роль в определении здоровья пожилых мужчин.

Список литературы/References

- Agahoz M.C., Timmermans M.A.M., Sladdens H.F.B.M., Foekens R., Trapman-Jansen A.M.A.C., Schröder C.P., van Leeuwen-Stok E., Martens J.W.M., Dinjens W.N.M., van Deurzen C.H.M. Loss of Y-chromosome during male breast carcinogenesis. *Cancers*. 2020; 12(3):631. DOI 10.3390/cancers12030631.
- Arseneault M., Monlong J., Vasudev N.S., Laskar R.S., Safsamghabadi M., Harden P., Egevad L., Nourbehesht N., Panichantakul P., Holcatova I., Brisuda A., Janout V., Kollarova H., Foretova L., Navratilova M., Mates D., Jinga V., Zaridze D., Mukeria A., Jandaghi P., Brennan P., Brazma A., Tost J., Scelo G., Banks R.E., Lathrop M., Bourque G., Riazalhosseini Y. Loss of chromosome Y leads to down regulation of KDM5D and KDM6C epigenetic modifiers in clear cell renal cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2017;7(1):44876. DOI 10.1038/srep44876.
- Behrens M., Lendon C., Roe C. A common biological mechanism in cancer and Alzheimer's disease? *Curr. Alzheimer Res.* 2009;6(3): 196-204. DOI 10.2174/156720509788486608.
- Bellenguez C., Küçükali F., Jansen I.E., Kleindam L., Moreno-Grau S., Amin N., Naj A.C., ... Schellenberg G.D., van Duijn C.M., Sims R., van der Flier W.M., Ruiz A., Ramirez A., Lambert J.-C. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat. Genet.* 2022;54(4):412-436. DOI 10.1038/s41588-022-01024-z.
- Beuzen F., Dubois S., Fléjou J.-F. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using in-situ hybridization. *Histopathology.* 2000;37(3):241-249. DOI 10.1046/j.1365-2559.2000.00887.x.
- Bianchi N.O. Y chromosome structural and functional changes in human malignant diseases. *Mutat. Res.* 2009;682(1):21-27. DOI 10.1016/j.mrrev.2009.02.001.
- Brémond A., Meynet O., Mahidine K., Coito S., Tichet M., Scotlandi K., Breitmayer J.-P., Gounon P., Gleeson P.A., Bernard A., Bernard G. Regulation of HLA class I surface expression requires CD99 and p230/golgin-245 interaction. *Blood.* 2009;113(2):347-357. DOI 10.1182/blood-2008-02-137745.

- Büschek F., Fraune C., Garmestani S., Simon R., Kluth M., Hübner C., Ketterer K., Eichelberg C., Höflmayer D., Jacobsen F., Wittmer C., Wilczak W., Sauter G., Fisch M., Eichenauer T., Rink M. Y-chromosome loss is frequent in male renal tumors. *Ann. Transl. Med.* 2021;9(3):209. DOI 10.21037/atm-20-3061.
- Cáceres A., Jene A., Esko T., Pérez-Jurado L.A., González J.R. Extreme downregulation of chromosome Y and cancer risk in men. *J. Natl. Cancer Inst.* 2020;112(9):913-920. DOI 10.1093/jnci/djz232.
- Cannon-Albright L.A., Farnham J.M., Bailey M., Albright F.S., Teerlink C.C., Agarwal N., Stephenson R.A., Thomas A. Identification of specific Y chromosomes associated with increased prostate cancer risk. *Prostate.* 2014;74(9):991-998. DOI 10.1002/pros.22821.
- Chapiro E., Antony-Debre I., Marchay N., Parizot C., Lesty C., Cung H.-A., Mathis S., Grelhier A., Maloum K., Choquet S., Azgoui Z., Uzunov M., Leblond V., Merle-Beral H., Sutton L., Davi F., Nguyen-Khac F. Sex chromosome loss may represent a disease-associated clonal population in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes. Cancer.* 2014;53(3):240-247. DOI 10.1002/gcc.22134.
- Chia-Hsien Cheng J., Chuang V.P., Cheng S.H., Lin Y.-M., Cheng T.-I., Yang P.-S., Jian J.J.-M., You D.-L., Horng C.-F., Huang A.T. Unresectable hepatocellular carcinoma treated with radiotherapy and/or chemoembolization. *Int. J. Cancer.* 2001;96(4):243-252. DOI 10.1002/ijc.1022.
- Clark A.G. The vital Y chromosome. *Nature.* 2014;508(7497):463-464. DOI 10.1038/508463a.
- Colaco S., Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018;16:1-24. DOI 10.1186/s12958-018-0330-5.
- de Knijff P. On the forensic use of Y-chromosome polymorphisms. *Genes.* 2022;13(5):898. DOI 10.3390/genes13050898.
- de Matos M., Posa I., Carvalho F., Morais V., Grosso A., de Almeida S. A systematic pan-cancer analysis of genetic heterogeneity reveals associations with epigenetic modifiers. *Cancers.* 2019;11(3):391. DOI 10.3390/cancers11030391.
- Duan Q., Gao Y., Cao X., Wang S., Xu M., Jones O.D., Xu X. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood cells is associated with age-related macular degeneration in men. *Cell Biosci.* 2022;12(1):73. DOI 10.1186/s13578-022-00811-9.
- Duijff P.H.G., Schultz N., Benezra R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int. J. Cancer.* 2013;132(10):2316-2326. DOI 10.1002/ijc.27924.
- Dumanski J.P., Rasi C., Lönn M., Davies H., Ingelsson M., Giedraitis V., Lannfelt L., Magnusson P.K.E., Lindgren C.M., Morris A.P., Cesarini D., Johannesson M., Tiensuu Janson E., Lind L., Pedersen N.L., Ingelsson E., Forsberg L.A. Mutagenesis. Smoking is associated with mosaic loss of chromosome Y. *Science.* 2015;347(6217):81-83. DOI 10.1126/science.1262092.
- Dumanski J.P., Lambert J.-C., Rasi C., Giedraitis V., Davies H., Grenier-Boley B., Lindgren C.M., Campion D., Dufouil C., Pasquier F., Amouyel P., Lannfelt L., Ingelsson M., Kilander L., Lind L., Forsberg L.A. Mosaic loss of chromosome Y in blood is associated with Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2016;98(6):1208-1219. DOI 10.1016/j.ajhg.2016.05.014.
- Dunford A., Weinstock D.M., Savova V., Schumacher S.E., Cleary J.P., Yoda A., Sullivan T.J., Hess J.M., Gimelbrant A.A., Beroukhim R., Lawrence M.S., Getz G., Lane A.A. Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat. Genet.* 2017;49(1):10-16. DOI 10.1038/ng.3726.
- Forsberg L.A., Rasi C., Razzaghi H.R., Pakalapati G., Waite L., Thilbeault K.S., Ronowicz A., Wineinger N.E., Tiwari H.K., Boomsma D., Westerman M.P., Harris J.R., Lyle R., Essand M., Eriksson F., Assimes T.L., Iribarren C., Strachan E., O'Hanlon T.P., Rider L.G., Miller F.W., Giedraitis V., Lannfelt L., Ingelsson M., Piotrowski A., Pedersen N.L., Absher D., Dumanski J.P. Age-related somatic structural changes in the nuclear genome of human blood cells. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(2):217-228. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.12.009.
- Forsberg L.A., Rasi C., Malmqvist N., Davies H., Pasupulati S., Pakalapati G., Sandgren J., de Ståhl T.D., Zaghlool A., Giedraitis V., Lannfelt L., Score J., Cross N.C.P., Absher D., Janson E.T., Lindgren C.M., Morris A.P., Ingelsson E., Lind L., Dumanski J.P. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. *Nat. Genet.* 2014;46(6):624-628. DOI 10.1038/ng.2966.
- Forsberg L.A., Halvardson J., Rychlicka-Buniowska E., Danielsson M., Moghadam B.T., Mattisson J., Rasi C., Davies H., Lind L., Giedraitis V., Lannfelt L., Kilander L., Ingelsson M., Dumanski J.P. Mosaic loss of chromosome Y in leukocytes matters. *Nat. Genet.* 2019;51(1):4-7. DOI 10.1038/s41588-018-0267-9.
- Ganster C., Kämpfe D., Jung K., Bräulke F., Shirmeshan K., Machherndl-Spandl S., Suessner S., Bramlage C.P., Legler T.J., Koziol M.J., Haase D., Schanz J. New data shed light on Y-loss-related pathogenesis in myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes. Cancer.* 2015;54(12):717-724. DOI 10.1002/gcc.22282.
- García-Isidoro M., Taberero M.D., Najera M.L., García J.L., Hernandez J.M., Duran A., San Miguel J.F., Orfao A. Clinical and biological characteristics of myelodysplastic syndromes with nulismy Y by fish. *Haematologica.* 1997;82(5):537-541.
- Genovese G., Kähler A.K., Handsaker R.E., Lindberg J., Rose S.A., Bakhoum S.F., Chambert K., Mick E., Neale B.M., Fromer M., Purcell S.M., Svantesson O., Landén M., Höglund M., Lehmann S., Gabriel S.B., Moran J.L., Lander E.S., Sullivan P.F., Sklar P., Grönberg H., Hultman C.M., McCarroll S.A. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2477-2487. DOI 10.1056/NEJMoa1409405.
- Gómez-Isla T., Price J.L., McKeel Jr. D.W., Morris J.C., Growdon J.H., Hyman B.T. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 1996;16(14):4491-4500. DOI 10.1523/JNEUROSCI.16-14-04491.1996.
- Graham E.J., Vermeulen M., Vardarajan B., Bennett D., De Jager P., Pearce R.V., Young-Pearse T.L., Mostafavi S. Somatic mosaicism of sex chromosomes in the blood and brain. *Brain Res.* 2019;1721:146345. DOI 10.1016/j.brainres.2019.146345.
- Guo X., Dai X., Zhou T., Wang H., Ni J., Xue J., Wang X. Mosaic loss of human Y chromosome: what, how and why. *Hum. Genet.* 2020;139(4):421-446. DOI 10.1007/s00439-020-02114-w.
- Guttenbach M., Schakowski R., Schmid M. Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei. *Hum. Genet.* 1994;94(3):295-298. DOI 10.1007/BF00208287.
- Hirata T., Hishimoto A., Otsuka I., Okazaki S., Boku S., Kimura A., Horai T., Sora I. Investigation of chromosome Y loss in men with schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2018;14:2115-2122. DOI 10.2147/NDT.S172886.
- Hollows R., Wei W., Cazier J., Mehanna H., Parry G., Halford G., Murray P. Association between loss of Y chromosome and poor prognosis in male head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2019;41(4):993-1006. DOI 10.1002/hed.25537.
- Holmes R.I., Keating M.J., Cork A., Trujillo J.M., McCredie K.B., Freireich E.J. Loss of the Y chromosome in acute myelogenous leukemia: A report of 13 patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1985;17(3):269-278. DOI 10.1016/0165-4608(85)90018-4.
- Hunter S., Gramlich T., Abbott K., Varma V. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: An in situ hybridization study. *Genes Chromosomes. Cancer.* 1993;8(3):172-177. DOI 10.1002/gcc.2870080306.
- Jacobs P.A., Brunton M., Court Brown W.M., Doll R., Goldstein H. Change of human chromosome count distributions with age: evidence for a sex difference. *Nature.* 1963;197(4872):1080-1081. DOI 10.1038/1971080a0.
- Jaiswal S., Fontanillas P., Flannick J., Manning A., Grauman P.V., Mar B.G., Lindley R.C., Mermel C.H., Burt N., Chavez A., Higgins J.M., Moltchanov V., Kuo F.C., Kluk M.J., Henderson B., Kinunnen L., Koistinen H.A., Ladenvall C., Getz G., Correa A., Banahan B.F., Gabriel S., Kathiresan S., Stringham H.M., McCarthy M.I., Boehnke M., Tuomilehto J., Haiman C., Groop L., Atzmon G., Wilson J.G., Neuberg D., Altshuler D., Ebert B.L. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2488-2498. DOI 10.1056/NEJMoa1408617.
- Jaiswal S., Natarajan P., Silver A.J., Gibson C.J., Bick A.G., Shvartz E., McConkey M., Gupta N., Gabriel S., Ardissino D., Baber U., Mehran R., Fuster V., Danesh J., Frossard P., Saleheen D., Melander O.,

- Sukhova G.K., Neuberg D., Libby P., Kathiresan S., Ebert B.L. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(2):111-121. DOI 10.1056/NEJMoa1701719.
- Jobling M.A., Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4(8):598-612. DOI 10.1038/nrg1124.
- Jobling M.A., Tyler-Smith C. Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(8):485-497. DOI 10.1038/nrg.2017.36.
- Kimura A., Hishimoto A., Otsuka I., Okazaki S., Boku S., Horai T., Izumi T., Takahashi M., Ueno Y., Shirakawa O., Sora I. Loss of chromosome Y in blood, but not in brain, of suicide completers. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190667. DOI 10.1371/journal.pone.0190667.
- Kobro-Flatmoen A., Lagartos-Donate M.J., Aman Y., Edison P., Witter M.P., Fang E.F. Re-emphasizing early Alzheimer's disease pathology starting in select entorhinal neurons, with a special focus on mitophagy. *Ageing Res. Rev.* 2021;67:101307. DOI 10.1016/j.arr.2021.101307.
- König J.J., Teubel W., Van Dongen J.W., Romijn J.C., Hagemeyer A., Schröder F.H. Loss and gain of chromosomes 1, 18, and Y in prostate cancer. *Prostate.* 1994;25(6):281-291. DOI 10.1002/pros.2990250602.
- Kowalski J., Morsberger L.A., Blackford A., Hawkins A., Yeo C.J., Hruban R.H., Griffin C.A. Chromosomal abnormalities of adenocarcinoma of the pancreas: identifying early and late changes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2007;178(1):26-35. DOI 10.1016/j.cancergencyto.2007.06.004.
- Kuznetsova I.L., Ponomareva N.V., Alemastseva E.A., Manakhov A.D., Andreeva T.V., Gusev F.E., Rogaev E.I. The interactive effect of genetic and epigenetic variations in *FKBP5* and *ApoE* genes on anxiety and brain EEG parameters. *Genes.* 2022;13(2):164. DOI 10.3390/genes13020164.
- Laine J., Künstle G., Obata T., Sha M., Noguchi M. The protooncogene *TCL1* is an akt kinase coactivator. *Mol. Cell.* 2000;6(2):395-407. DOI 10.1016/S1097-2765(00)00039-3.
- Lanni C., Masi M., Racchi M., Govoni S. Cancer and Alzheimer's disease inverse relationship: an age-associated diverging derailment of shared pathways. *Mol. Psychiatry.* 2021;26(1):280-295. DOI 10.1038/s41380-020-0760-2.
- Lippert E., Etienne G., Mozziconacci M.-J., Laibe S., Gervais C., Girault S., Gachard N., Tigaud I., Dastugue N., Huguet F., Fort M.-P., Legros L., Eclache V., Mahon F.-X. Loss of the Y chromosome in Philadelphia-positive cells predicts a poor response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib mesylate therapy. *Haematologica.* 2010;95(9):1604-1607. DOI 10.3324/haematol.2009.019109.
- Ljungström V., Mattisson J., Halvardson J., Pandzic T., Davies H., Rychlicka-Buniowska E., Danielsson M., Lacaze P., Cavelier L., Dumanski J.P., Baliakas P., Forsberg L.A. Loss of Y and clonal hematopoiesis in blood – two sides of the same coin? *Leukemia.* 2022;36(3):889-891. DOI 10.1038/s41375-021-01456-2.
- Lleo A., Oertelt-Prigione S., Bianchi I., Caliani L., Finelli P., Miozzo M., Lazzari R., Floreani A., Donato F., Colombo M., Gershwin M.E., Podda M., Invernizzi P. Y chromosome loss in male patients with primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* 2013;41:87-91. DOI 10.1016/j.jaut.2012.12.008.
- Loftfield E., Zhou W., Graubard B.I., Yeager M., Chanock S.J., Freedman N.D., Machiela M.J. Predictors of mosaic chromosome Y loss and associations with mortality in the UK Biobank. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12316. DOI 10.1038/s41598-018-30759-1.
- Loftfield E., Zhou W., Yeager M., Chanock S.J., Freedman N.D., Machiela M.J. Mosaic Y loss is moderately associated with solid tumor risk. *Cancer Res.* 2019;79(3):461-466. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-2566.
- Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Genes Chromosom. Cancer.* 1992;5(1):83-88. DOI 10.1002/gcc.2870050112.
- Ly P., Brunner S.F., Shoshani O., Kim D.H., Lan W., Pyntikova T., Flanagan A.M., Behjati S., Page D.C., Campbell P.J., Cleveland D.W. Chromosome segregation errors generate a diverse spectrum of simple and complex genomic rearrangements. *Nat. Genet.* 2019;51(4):705-715. DOI 10.1038/s41588-019-0360-8.
- Maan A.A., Eales J., Akbarov A., Rowland J., Xu X., Jobling M.A., Charchar F.J., Tomaszewski M. The Y chromosome: a blueprint for men's health? *Eur. J. Hum. Genet.* 2017;25(11):1181-1188. DOI 10.1038/ejhg.2017.128.
- Masters C.L., Bateman R., Blennow K., Rowe C.C., Sperling R.A., Cummings J.L. Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015;1(1):15056. DOI 10.1038/nrdp.2015.56.
- Mattisson J., Danielsson M., Hammond M., Davies H., Gallant C.J., Nordlund J., Raine A., Edén M., Kilander L., Ingelsson M., Dumanski J.P., Halvardson J., Forsberg L.A. Leukocytes with chromosome Y loss have reduced abundance of the cell surface immunoprotein CD99. *Sci. Rep.* 2021;11(1):15160. DOI 10.1038/s41598-021-94588-5.
- Mendivil-Perez M., Velez-Pardo C., Kosik K.S., Lopera F., Jimenez-Del-Rio M. iPSCs-derived nerve-like cells from familial Alzheimer's disease PSEN 1 E280A reveal increased amyloid-beta levels and loss of the Y chromosome. *Neurosci. Lett.* 2019;703:111-118. DOI 10.1016/j.neulet.2019.03.032.
- Minner S., Kilgué A., Stahl P., Weikert S., Rink M., Dahlem R., Fisch M., Höppner W., Wagner W., Bokemeyer C., Terracciano L., Simon R., Sauter G., Wilczak W. Y chromosome loss is a frequent early event in urothelial bladder cancer. *Pathology.* 2010;42(4):356-359. DOI 10.3109/0013021003767298.
- Murakami S., Chishima S., Uemoto H., Sakamoto E., Sato T., Kurabe N., Kawasaki Y., Shibata T., Akiyama H., Tashiro F. The male-specific factor Sry harbors an oncogenic function. *Oncogene.* 2014;33(23):2978-2986. DOI 10.1038/onc.2013.262.
- Nebel A., Kleindorfer R., Caliebe A., Nothnagel M., Blanche H., Junge O., Wittig M., Ellinghaus D., Flachsbarth F., Wichmann H.-E., Meitinger T., Nikolaus S., Franke A., Krawczak M., Lathrop M., Schreiber S. A genome-wide association study confirms *APOE* as the major gene influencing survival in long-lived individuals. *Mech. Ageing Dev.* 2011;132(6-7):324-330. DOI 10.1016/j.mad.2011.06.008.
- Noveski P., Madjunkova S., Sukarova Stefanovska E., Matevska Geshkovska N., Kuzmanovska M., Dimovski A., Plaseska-Karanfilska D. Loss of Y chromosome in peripheral blood of colorectal and prostate cancer patients. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146264. DOI 10.1371/journal.pone.0146264.
- Ouseph M.M., Hasserjian R.P., Dal Cin P., Lovitch S.B., Steensma D.P., Nardi V., Weinberg O.K. Genomic alterations in patients with somatic loss of the Y chromosome as the sole cytogenetic finding in bone marrow cells. *Haematologica.* 2021;106(2):555-564. DOI 10.3324/haematol.2019.240689.
- Parker K., Erzurumluoglu A.M., Rodriguez S. The Y chromosome: a complex locus for genetic analyses of complex human traits. *Genes.* 2020;11(11):1273. DOI 10.3390/genes11111273.
- Pasello M., Manara M.C., Scotlandi K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. *J. Cell Commun. Signal.* 2018;12(1):55-68. DOI 10.1007/s12079-017-0445-z.
- Persani L., Bonomi M., Lleo A., Pasini S., Civardi F., Bianchi I., Campi I., Finelli P., Miozzo M., Castronovo C., Sirchia S., Gershwin M.E., Invernizzi P. Increased loss of the Y chromosome in peripheral blood cells in male patients with autoimmune thyroiditis. *J. Autoimmun.* 2012;38(2-3):J193-J196. DOI 10.1016/j.jaut.2011.11.011.
- Pierre R.V., Hoagland H.C. Age-associated aneuploidy: Loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. *Cancer.* 1972;30(4):889-894. DOI 10.1002/1097-0142(197210)30:4<889::aid-cnrcr2820300405>3.0.co;2-1.
- Qin N., Li N., Wang C., Pu Z., Ma Z., Jin G., Zhu M., Dai M., Hu Z., Ma H., Shen H. Association of mosaic loss of chromosome Y with lung cancer risk and prognosis in a Chinese population. *J. Thorac. Oncol.* 2019;14(1):37-44. DOI 10.1016/j.jtho.2018.09.013.
- Rhie A., Nurk S., Cechova M., Hoyt S.J., Taylor D.J., Altemose N., Hook P.W., ... Zook J.M., Eichler E.E., O'Neill R., Schatz M.C.,

- Miga K.H., Makova K.D., Phillippy A.M. The complete sequence of a human Y chromosome. *bioRxiv*. 2022. DOI 10.1101/2022.12.01.518724.
- Riaz M., Mattisson J., Polekhina G., Bakshi A., Halvardson J., Danielsson M., Ameer A., McNeil J., Forsberg L.A., Lacaze P. A polygenic risk score predicts mosaic loss of chromosome Y in circulating blood cells. *Cell Biosci*. 2021;11(1):205. DOI 10.1186/s13578-021-00716-z.
- Sandberg A.A. Chromosome changes in early bladder neoplasms. *J. Cell. Biochem*. 1992;50(S161):76-79. DOI 10.1002/jcb.240501317.
- Sano S., Horitani K., Ogawa H., Halvardson J., Chavkin N.W., Wang Y., Sano M., Mattisson J., Hata A., Danielsson M., Miura-Yura E., Zaghlool A., Evans M.A., Fall T., De Hoyos H.N., Sundström J., Yura Y., Kour A., Arai Yohei, Thel M.C., Arai Yuka, Mychaleckyj J.C., Hirsch K.K., Forsberg L.A., Walsh K. Hematopoietic loss of Y chromosome leads to cardiac fibrosis and heart failure mortality. *Science*. 2022;377(6603):292-297. DOI 10.1126/science.abn3100.
- Sauter G., Moch H., Wagner U., Novotna H., Gasser T.C., Mattarelli G., Mihatsch M.J., Waldman F.M. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet*. 1995;82(2):163-169. DOI 10.1016/0165-4608(95)00030-S.
- Schenkel A.R., Mamdouh Z., Chen X., Liebman R.M., Muller W.A. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol*. 2002;3(2):143-150. DOI 10.1038/ni749.
- Sharp A.J., Stathaki E., Migliavacca E., Brahmachary M., Montgomery S.B., Dupre Y., Antonarakis S.E. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res*. 2011;21(10):1592-1600. DOI 10.1101/gr.112680.110.
- Sherva R., Tripodis Y., Bennett D.A., Chibnik L.B., Crane P.K., de Jager P.L., Farrer L.A., Saykin A.J., Shulman J.M., Naj A., Green R.C. Genome-wide association study of the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1):45-52. DOI 10.1016/j.jalz.2013.01.008.
- Silva Veiga L.C., Bergamo N.A., Reis P.P., Kowalski L.P., Rogat- to S.R. Loss of Y-chromosome does not correlate with age at onset of head and neck carcinoma: a case-control study. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2012;45(2):172-178. DOI 10.1590/S0100-879X20120075 00004.
- Sohn H.W., Shin Y.K., Lee I.-S., Bae Y.M., Suh Y.H., Kim M.K., Kim T.J., Jung K.C., Park W.S., Park C.-S., Chung D.H., Ahn K., Kim I.S., Ko Y.H., Bang Y.J., Kim C.W., Park S.H. CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the cell surface. *J. Immunol*. 2001;166(2):787-794. DOI 10.4049/jimmunol.166.2.787.
- Sorbi S., Nacmias B., Forleo P., Piacentini S., Sherrington R., Rogaev E., Amaducci L. Misserise mutation of S182 gene in Italian families with early-onset Alzheimer's disease. *Lancet*. 1995;346(8972):439-440. DOI 10.1016/S0140-6736(95)92809-X.
- Stahl P.R., Kilgué A., Tennstedt P., Minner S., Krohn A., Simon R., Krause G.V., Izbicki J., Graefen M., Sauter G., Schlomm T., Wilczak W. Y chromosome losses are exceedingly rare in prostate cancer and unrelated to patient age. *Prostate*. 2012;72(8):898-903. DOI 10.1002/pros.21492.
- Takahashi S., Qian J., Brown J.A., Alcaraz A., Bostwick D.G., Lieber M.M., Jenkins R.B. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence *in situ* hybridization in needle biopsies. *Cancer Res*. 1994;54(13):3574-3579.
- Terao C., Momozawa Y., Ishigaki K., Kawakami E., Akiyama M., Loh P.-R., Genovese G., Sugishita H., Ohta T., Hirata M., Perry J.R.B., Matsuda K., Murakami Y., Kubo M., Kamatani Y. GWAS of mosaic loss of chromosome Y highlights genetic effects on blood cell differentiation. *Nat. Commun*. 2019;10(1):4719. DOI 10.1038/s41467-019-12705-5.
- Thompson D.J., Genovese G., Halvardson J., Ulirsch J.C., Wright D.J., Terao C., Davidsson O.B., ... Ong K.K., Machiela M.J., Loh P.-R., Dumanski J.P., Chanock S.J., Forsberg L.A., Perry J.R.B. Genetic predisposition to mosaic Y chromosome loss in blood. *Nature*. 2019;575(7784):652-657. DOI 10.1038/s41586-019-1765-3.
- Vakilian H., Mirzaei M., Sharifi Tabar M., Pooyan P., Habibi Rezaee L., Parker L., Haynes P.A., Gourabi H., Baharvand H., Salekdeh G.H. *DDX3Y*, a male-specific region of Y chromosome gene, may modulate neuronal differentiation. *J. Proteome Res*. 2015;14(9):3474-3483. DOI 10.1021/acs.jproteome.5b00512.
- van Dekken H., Pizzolo J.G., Kelsen D.P., Melamed M.R. Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by *in situ* hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. *Cancer*. 1990;66(3):491-497. DOI 10.1002/1097-0142(19900801)66:3<491::aid-cnrcr2820660315>3.0.co;2-Q.
- Vermeulen M.C., Pearse R., Young-Pearse T., Mostafavi S. Mosaic loss of chromosome Y in aged human microglia. *Genome Res*. 2022;32(10):1795-1807. DOI 10.1101/gr.276409.121.
- Wiktor A., Rybicki B.A., Piao Z.S., Shurafa M., Barthel B., Maeda K., Van Dyke D.L. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;27(1):11-16. DOI 10.1002/(SICI)1098-2264(200001)27:1<11::aid-gcc2>3.0.co;2-I.
- Willis-Owen S.A.G., Domingo-Sabugo C., Starren E., Liang L., Freidin M.B., Arseneault M., Zhang Y., Lu S.K., Popat S., Lim E., Nicholson A.G., Riazalhosseini Y., Lathrop M., Cookson W.O.C., Moffatt M.F. Y disruption, autosomal hypomethylation and poor male lung cancer survival. *Sci. Rep*. 2021;11(1):12453. DOI 10.1038/s41598-021-91907-8.
- Wright D.J., Day F.R., Kerrison N.D., Zink F., Cardona A., Sulem P., Thompson D.J., Sigurjonsdottir S., Gudbjartsson D.F., Helgason A., Chapman J.R., Jackson S.P., Langenberg C., Wareham N.J., Scott R.A., Thorsteindottir U., Ong K.K., Stefansson K., Perry J.R.B. Genetic variants associated with mosaic Y chromosome loss highlight cell cycle genes and overlap with cancer susceptibility. *Nat. Genet*. 2017;49(5):674-679. DOI 10.1038/ng.3821.
- Xue Y., Tyler-Smith C. Past successes and future opportunities for the genetics of the human Y chromosome. *Hum. Genet*. 2017;136(5):481-483. DOI 10.1007/s00439-017-1806-7.
- Yamazaki Y., Zhao N., Caulfield T.R., Liu C.-C., Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat. Rev. Neurol*. 2019;15(9):501-518. DOI 10.1038/s41582-019-0228-7.
- Yan L., Cogan J.D., Hedges L.K., Nunley B., Hamid R., Austin E.D. The Y chromosome regulates BMP2 expression via SRY: A possible reason "Why" fewer males develop pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2018;198(12):1581-1583. DOI 10.1164/rccm.201802-0308LE.
- Zhang L., Shin E.S., Yu Z., Li S. Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders. *Chin. Med. J.* 2007;120(22):2002-2005.
- Zhou W., Machiela M.J., Freedman N.D., Rothman N., Malats N., Dagnall C., Caporaso N., Teras L.T., Gaudet M.M., Gapstur S.M., Stevens V.L., Jacobs K.B., Sampson J., Albanes D., Weinstein S., Virtamo J., Berndt S., Hoover R.N., Black A., Silverman D., Figueroa J., Garcia-Closas M., Real F.X., Earl J., Marenne G., Rodriguez-Santiago B., Karagas M., Johnson A., Schwenn M., Wu X., Gu J., Ye Y., Hutchinson A., Tucker M., Perez-Jurado L.A., Dean M., Yeager M., Chanock S.J. Mosaic loss of chromosome Y is associated with common variation near *TCL1A*. *Nat. Genet*. 2016;48(5):563-568. DOI 10.1038/ng.3545.

ORCID ID

I.L. Kuznetsova orcid.org/0000-0002-7785-734X
L.I. Uralsky orcid.org/0000-0002-5565-7961

T.V. Tyazhelova orcid.org/0000-0002-0594-0654
E.I. Rogaev orcid.org/0000-0003-0594-4767

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 19-75-30039.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.12.2022. После доработки 14.02.2023. Принята к публикации 14.02.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Роль генов PI3K/АКТ/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов в развитии хронической обструктивной болезни легких

Г.Ф. Корытина^{1,2}✉, Л.З. Ахмадишина¹, В.А. Маркелов^{1,2}, Ю.Г. Азнабаева², О.В. Кочетова¹, Т.Р. Насибуллин¹, А.П. Ларкина¹, Н.Н. Хуснутдинова¹, Н.Ш. Загидуллин², Т.В. Викторова²

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

✉ guly_kory@mail.ru

Аннотация. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – многофакторное заболевание дыхательной системы, развивающееся в результате комплексного взаимодействия молекулярно-генетических и средовых факторов, тесно связанных с образом жизни. Цель исследования – анализ комбинированного вклада генов PI3K/АКТ/mTOR-сигнального каскада (*PIK3R1*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*) и сиртуинов (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*) в риск развития хронической обструктивной болезни легких. В работе использованы образцы ДНК 1245 индивидов. Полиморфные варианты генов *SIRT1* (rs3758391, rs3818292), *SIRT3* (rs3782116, rs536715), *SIRT6* (rs107251), *AKT1* (rs2494732), *PIK3R1* (rs10515070, rs831125, rs3730089), *MTOR* (rs2295080, rs2536), *PTEN* (rs701848, rs2735343) анализировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Логистическую регрессию использовали для выявления ассоциации полиморфных локусов в различных моделях. Проводили линейный регрессионный анализ для оценки вклада генотипов изучаемых локусов в вариабельность показателей функции внешнего дыхания и индекса курения. Установлена ассоциация генов: *SIRT1* (rs3818292) ($P = 0.001$, OR = 1.51 для генотипа AG), *SIRT3* (rs3782116) ($P = 0.0055$, OR = 0.69) и *SIRT3* (rs536715) ($P = 0.00001$, OR = 0.50) в доминантной модели; *SIRT6* (rs107251) ($P = 0.00001$, OR = 0.55 для генотипа CT), *PIK3R1*: (rs10515070 ($P = 0.0023$, OR = 1.47 для генотипа AT), rs831125 ($P = 0.00001$, OR = 2.28 для генотипа AG), rs3730089 ($P = 0.0007$, OR = 1.73 для генотипа GG)) и *PTEN*: (rs701848 ($P = 0.0015$, OR = 1.35 в лог-аддитивной модели) и rs2735343 ($P = 0.0001$, OR = 1.64 для генотипа GC)). Обнаружена вариабельность показателей функции легочного дыхания в зависимости от полиморфных вариантов генов *SIRT1* (rs3818292), *SIRT3* (rs3782116), *PIK3R1* (rs3730089) и *MTOR* (rs2536). Идентифицированы ген-генные сочетания, ассоциированные с ХОБЛ; наибольший риск развития ХОБЛ определялся сочетанием аллеля G гена *PIK3R1* (rs831125) с генотипом GG гена *SIRT3* (rs536715) (OR = 3.45). Полученные результаты полигенного анализа указывают на взаимодействие генов, кодирующих сиртуины *SIRT3*, *SIRT2*, *SIRT6* и *PIK3R1*, *PTEN*, *MTOR*, и находят подтверждение в функциональной взаимосвязи сиртуинов и PI3K/АКТ/mTOR-сигнального каскада.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких; PI3K/АКТ/mTOR-сигнальный каскад; сиртуины; клеточное старение; окислительный стресс.

Для цитирования: Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З., Маркелов В.А., Азнабаева Ю.Г., Кочетова О.В., Насибуллин Т.Р., Ларкина А.П., Хуснутдинова Н.Н., Загидуллин Н.Ш., Викторова Т.В. Роль генов PI3K/АКТ/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов в развитии хронической обструктивной болезни легких. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):512-521. DOI 10.18699/VJGB-23-62

Role of PI3K/АКТ/mTOR signaling pathway and sirtuin genes in chronic obstructive pulmonary disease development

G.F. Korytina^{1,2}✉, L.Z. Akhmadishina¹, V.A. Markelov^{1,2}, Y.G. Aznabaeva², O.V. Kochetova¹, T.R. Nasibullin¹, A.P. Larkina¹, N.N. Khusnutdinova¹, N.Sh. Zagidullin², T.V. Victorova²

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

✉ guly_kory@mail.ru

Abstract. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a multifactorial disease of the respiratory system which develops as a result of a complex interaction of genetic and environmental factors closely related to lifestyle. We aimed to assess the combined effect of the PI3K/АКТ/mTOR signaling pathway (*PIK3R1*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*) and sirtuin (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*) genes to COPD risk. SNPs of *SIRT1* (rs3758391, rs3818292), *SIRT3* (rs3782116, rs536715), *SIRT6* (rs107251), *AKT1* (rs2494732), *PIK3R1* (rs10515070, rs831125, rs3730089), *MTOR* (rs2295080, rs2536), *PTEN* (rs701848, rs2735343) genes were genotyped by real-time polymerase chain reaction (PCR) among 1245 case and

control samples. Logistic regression was used to detect the association of SNPs in different models. Linear regression analyses were performed to estimate the relationship between SNPs and lung function parameters and smoking pack-years. Significant associations with COPD were identified for *SIRT1* (rs3818292) ($P = 0.001$, OR = 1.51 for AG), *SIRT3* (rs3782116) ($P = 0.0055$, OR = 0.69) and *SIRT3* (rs536715) ($P = 0.00001$, OR = 0.50) under the dominant model, *SIRT6* (rs107251) ($P = 0.00001$, OR = 0.55 for CT), *PIK3R1*: (rs10515070 ($P = 0.0023$, OR = 1.47 for AT), rs831125 ($P = 0.00001$, OR = 2.28 for AG), rs3730089 ($P = 0.0007$, OR = 1.73 for GG)), *PTEN*: (rs701848 ($P = 0.0015$, OR = 1.35 under the log-additive model), and rs2735343 ($P = 0.0001$, OR = 1.64 for GC)). A significant genotype-dependent variation of lung function parameters was observed for *SIRT1* (rs3818292), *SIRT3* (rs3782116), *PIK3R1* (rs3730089), and *MTOR* (rs2536). Gene-gene combinations that remained significantly associated with COPD were obtained; the highest risk of COPD was conferred by a combination of G allele of the *PIK3R1* (rs831125) gene and GG of *SIRT3* (rs536715) (OR = 3.45). The obtained results of polygenic analysis indicate the interaction of genes encoding sirtuins *SIRT3*, *SIRT2*, *SIRT6* and *PIK3R1*, *PTEN*, *MTOR* and confirm the functional relationship between sirtuins and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; sirtuins; cellular senescence; oxidative stress.

For citation: Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Markelov V.A., Aznabaeva Y.G., Kochetova O.V., Nasibullin T.R., Larkina A.P., Khusnutdinova N.N., Zagidullin N.Sh., Victorova T.V. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and sirtuin genes in chronic obstructive pulmonary disease development. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):512-521. DOI 10.18699/VJGB-23-62

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – многофакторное заболевание дыхательной системы, затрагивающее дистальные отделы респираторных путей (bronхи, бронхиолы) и легочную паренхиму, с развитием эмфиземы легких (Чучалин и др., 2022). Это заболевание развивается в результате комплексного взаимодействия молекулярно-генетических и средовых факторов, тесно связанных с образом жизни, и курение считается основной причиной возникновения ХОБЛ (Ragland et al., 2019). Опубликованные данные свидетельствуют о том, что патогенез ХОБЛ может включать нарушение регуляции стрессовых реакций, препятствующих клеточному старению, с широким кругом сигнальных каскадов и их регуляторов (Ryter et al., 2018).

PI3K/AKT/mTOR-внутриклеточный сигнальный путь – один из универсальных путей контроля роста, метаболизма и пролиферации клеток (Ersahin et al., 2015). Ключевыми компонентами сигнального пути являются: фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), серин/треониновая протеинкиназа (AKT) и серин/треонин киназа (mammalian target of rapamycin) (mTOR) (Ersahin et al., 2015). Передача сигналов через PI3K/AKT/mTOR-сигнальный каскад имеет решающее значение для клеточного старения. Этот сигнальный каскад ингибируется тирозинфосфатазами PTEN (phosphatase and tensin homolog) и SHIP-1 (inositol polyphosphate-5-phosphatase D). Оба фермента имеют чувствительные к окислению остатки цистеина в активном сайте (Worby, Dixon, 2014).

Окислительный стресс – основной механизм, который вызывает ускоренное старение за счет его повреждающего воздействия на ДНК и активации PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада (Wang et al., 2013). При ХОБЛ и других возраст-ассоциированных заболеваниях экспрессия генов, кодирующих эндогенные антиоксидантные молекулы, снижается, что еще больше увеличивает уровень окислительного стресса и приводит к активации клеточного старения (Kirkham, Barnes, 2013). В качестве

потенциальных факторов, замедляющих старение, рассматриваются НАД-зависимые протеин-деацетилазы из семейства сиртуинов (Ito, Barnes, 2009).

Цель настоящего исследования – анализ комбинированного вклада генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада (*PIK3R1*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*) и сиртуинов (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6*) в риск развития хронической обструктивной болезни легких.

Материалы и методы

В работе использовали образцы ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Исследование одобрено комитетом по этике Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (протокол № 17 от 07.12.2010). От всех включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Группа больных включала 621 индивида (из них 539 мужчин (86.79 %) и 82 женщины (13.21 %)), средний возраст составил 64.42 ± 10.71 лет. Среди больных ХОБЛ курильщиков и бывших курильщиков – 510 (82.13 %), некурящих – 111 (17.87 %). Индекс курения у курильщиков и бывших курильщиков составил 45.34 ± 23.84 пачек/лет. Группа контроля включала 624 индивида (из них 555 мужчин (89.94 %) и 69 женщин (11.06 %)), средний возраст был 59.67 ± 12.31 , курильщики и бывшие курильщики – 526 (84.29 %) и некурящие – 98 (15.71 %); индекс курения у курильщиков составлял 38.75 ± 24.87 пачек/лет.

У всех больных исследовали функцию внешнего дыхания методом спирометрии, оценивали жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), соотношение объема форсированного выдоха в 1 с и жизненной емкости легких (ОФВ1/ЖЕЛ). В группе больных показатели (в % от нормы) составляли: ОФВ1 = 40.75 ± 18.33 ; ФЖЕЛ = 45.01 ± 18.22 ;

ЖЕЛ = 49.32 ± 14.34 ; ОФВ1/ФЖЕЛ = 59.5 ± 12.34 . Критерии включения и исключения из групп исследования подробно описаны нами ранее (Korytina et al., 2019).

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции. Для нашего исследования были выбраны следующие полиморфные локусы: *SIRT1* (rs3758391, rs3818292), *SIRT3* (rs3782116, rs536715), *SIRT6* (rs107251), *AKT1* (rs2494732), *PIK3R1* (rs10515070, rs831125, rs3730089), *MTOR* (rs2295080, rs2536), *P TEN* (rs701848, rs2735343) (Приложение 1)¹.

Критерии отбора полиморфных локусов: имеющие функциональную значимость и/или ассоциацию с многофакторными заболеваниями человека, частота редкого аллеля (MAF) $\geq 5\%$ в популяциях европеоидов, по данным базы the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Функциональная значимость полиморфных локусов исследовали по базам RegulomeDB Version 1.1 (<https://regulomedb.org>), SNPinfo Web Server (<https://snpinfo.nih.gov>) и HaploReg v3 (Ward, Kellis, 2016). Данные представлены в Приложении 2. Полиморфные варианты генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени коммерческими наборами с флуоресцентной детекцией (<https://www.oligos.ru>, ООО «ДНК-Синтез», Россия) на приборе BioRad CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Методы анализа подробно описаны нами ранее (Korytina et al., 2019).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакетов прикладных программ IBM SPSS Statistics v22.0 и PLINK v. 1.07 (Purcell et al., 2007). Подробное описание стандартных методов статистического анализа представлено в (Korytina et al., 2019). Анализ ассоциаций сочетаний аллелей/генотипов с ХОБЛ осуществляли с помощью программы APSampler 3.6.1 (<http://sourceforge.net/projects/apsampler/>). Поправку на множественное тестирование проводили с помощью метода оценки доли ложноположительных результатов FDR (false discovery rate) (Benjamini–Hochberg), при использовании программы (<http://www.sdmproject.com/utilinies/?show=FDR>) и получали новое значение $P_{\text{cor-FDR}}$. Частоты гаплотипов, стандартные коэффициенты сцепления для LD (D') были рассчитаны в программе Haploview 4.2.

Результаты

Прежде чем приступить к анализу ассоциации генов-кандидатов с развитием ХОБЛ, осуществили проверку соответствия распределения частот генотипов полиморфных локусов равновесию Харди–Вайнберга, а также оценку частоты редкого аллеля как для смешанной выборки больных и контроля, так и отдельно для каждой группы (см. Приложение 1). Выявленные частоты генотипов всех исследованных полиморфных локусов в группе контроля были в соответствии равновесию Харди–Вайнберга: *SIRT1* (rs3758391) ($P_{\text{Х-В}} = 0.24$), *SIRT1* (rs3818292) ($P_{\text{Х-В}} = 0.47$), *SIRT3* (rs3782116) ($P_{\text{Х-В}} = 0.5$), *SIRT3* (rs536715) ($P_{\text{Х-В}} = 0.75$), *SIRT6* (rs107251) ($P_{\text{Х-В}} = 0.67$),

AKT1 (rs2494732) ($P_{\text{Х-В}} = 0.2$), *PIK3R1* (rs10515070) ($P_{\text{Х-В}} = 0.65$), *PIK3R1* (rs831125) ($P_{\text{Х-В}} = 0.25$), *PIK3R1* (rs3730089) ($P_{\text{Х-В}} = 0.22$), *MTOR* (rs2295080) ($P_{\text{Х-В}} = 0.15$), *MTOR* (rs2536) ($P_{\text{Х-В}} = 0.24$), *P TEN* (rs701848) ($P_{\text{Х-В}} = 0.85$), *P TEN* (rs2735343) ($P_{\text{Х-В}} = 0.06$).

Обнаружены статистически значимые различия по распределению частот генотипов и/или аллелей между группами больных ХОБЛ и контролем для полиморфных локусов генов *SIRT1* (rs3818292), *SIRT3* (rs3782116, rs536715), *SIRT6* (rs107251), *AKT1* (rs2494732), *PIK3R1* (rs10515070, rs831125, rs3730089), *P TEN* (rs701848, rs2735343) (табл. 1). Статистически значимые ассоциации исследованных полиморфных локусов с развитием ХОБЛ резюмированы в табл. 2.

Установлена ассоциация локуса *SIRT1* (rs3818292) с ХОБЛ в доминантной модели ($P_{\text{adj}} = 0.0066$, OR = 1.40), риск развития заболевания возрастал у носителей гетерозиготного генотипа ($P_{\text{adj}} = 0.001$, OR = 1.51). Полиморфные варианты локусов rs3782116 и rs536715 гена *SIRT3* ассоциировали с ХОБЛ; так, для rs3782116 статистически значимой была ассоциация с гетерозиготным генотипом ($P_{\text{adj}} = 0.0052$, OR = 0.69) и в доминантной модели ($P_{\text{adj}} = 0.0055$, OR = 0.69). Ассоциация с локусом rs536715 подтверждалась в доминантной ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.50) и аддитивной ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.66) моделях и с гетерозиготным генотипом ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.48). Необходимо отметить, что риск развития заболевания был в обоих случаях связан с частым аллелем G (rs3782116 – OR = 1.21 95 % CI 1.03–1.43 и rs536715 – OR = 1.58 95 % CI 1.32–1.91) гомозиготным генотипом GG (rs3782116 – OR = 1.44 95 % CI 1.16–1.81 и rs536715 – OR = 1.99 95 % CI 1.58–2.51).

Нами проведен анализ сцепления локусов rs3758391 и rs3818292 гена *SIRT1*, rs3782116 и rs536715 гена *SIRT3*, который показал отсутствие неравновесия по сцеплению между локусами гена *SIRT1* ($D' = 0.168$, $r^2 = 0.097$) и гена *SIRT3* ($D' = 0.28$, $r^2 = 0.011$). Исходя из полученных данных, анализ ассоциации гаплотипов исследованных локусов с ХОБЛ не проводили. Локус *SIRT6* (rs107251) ассоциировал с ХОБЛ с доминантной модели ($P_{\text{adj}} = 0.0005$, OR = 0.65), но более значимой была ассоциация с гетерозиготным генотипом СТ ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 0.55). Маркером риска выступал гомозиготный по частому аллелю генотип СС (OR = 1.54 95 % CI 1.23–1.93).

Выявлены статистически значимые ассоциации полиморфных локусов rs10515070, rs831125, rs3730089 гена *PIK3R1* с развитием ХОБЛ. Риск развития заболевания был связан с гетерозиготными генотипами исследованных полиморфных локусов гена *PIK3R1*: rs10515070 ($P_{\text{adj}} = 0.0023$, OR = 1.47), rs831125 ($P_{\text{adj}} = 0.00001$, OR = 2.28) и генотипом GG rs3730089 ($P_{\text{adj}} = 0.0007$, OR = 1.73). Локусы rs10515070, rs831125, rs3730089 показали отсутствие неравновесия по сцеплению; так, для rs10515070 и rs831125 составили: $D' = 0.02$, $r^2 = 0.00$, для rs10515070 и rs3730089 – $D' = 0.127$, $r^2 = 0.008$, для rs831125 и rs3730089 – $D' = 0.155$, $r^2 = 0.005$.

Анализ ассоциации гаплотипов гена *PIK3R1* не проводили. Установлены статистически значимые ассоциации полиморфных локусов rs701848 и rs2735343 гена *P TEN* с ХОБЛ. Ассоциация локуса rs701848 подтверждена в

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx18.pdf>

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов в группах больных ХОБЛ и здоровых индивидов

Ген, локус	Редкий аллель	Генотипы, аллели	ХОБЛ, n (%) (N = 621)	Здоровые индивиды, n (%) (N = 624)	P
<i>SIRT1</i> rs3758391 T>C	C	TT/TC/CC	184/265/172 (29.63/42.67/27.70)	168/294/162 (26.92/47.12/25.96)	0.283
		T/C	633/609 (50.97/49.03)	630/618 (50.48/49.52)	0.84
<i>SIRT1</i> rs3818292 A>G	G	AA/AG/GG	322/273/26 (51.85/43.96/4.19)	375/213/36 (60.10/34.13/5.77)	0.001
		A/G	917/325 (73.83/26.17)	963/285 (77.16/22.84)	0.059
<i>SIRT3</i> rs3782116 G>A	A	GG/GA/AA	294/230/97 (47.34/37.04/15.62)	239/287/98 (38.30/45.99/15.71)	0.003
		G/A	818/424 (65.86/34.14)	765/483 (61.30/38.70)	0.02
<i>SIRT3</i> rs536715 G>A	A	GG/GA/AA	424/148/49 (68.28/23.83/7.89)	324/249/51 (51.92/39.90/8.17)	0.00001
		G/A	996/246 (80.19/19.81)	897/351 (71.88/28.13)	0.00001
<i>SIRT6</i> rs107251 C>T	T	CC/CT/TT	396/160/65 (63.77/25.76/10.47)	333/243/48 (53.37/38.94/7.69)	0.0001
		C/T	952/290 (76.65/23.35)	909/339 (72.84/27.16)	0.032
<i>AKT1</i> rs2494732 T>C	C	TT/CT/CC	193/313/115 (31.08/50.40/18.52)	159/329/136 (25.48/52.72/21.79)	0.062
		T/C	699/543 (56.28/43.72)	647/601 (51.84/48.16)	0.029
<i>PIK3R1</i> rs10515070 T>A	A	TT/TA/AA	175/351/95 (28.18/56.52/15.30)	228/293/103 (36.54/46.96/16.51)	0.001
		T/A	701/541 (56.44/43.56)	749/499 (60.02/39.98)	0.077
<i>PIK3R1</i> rs831125 A>G	G	AA/AG/GG	299/274/48 (48.15/44.12/7.73)	441/161/22 (70.67/25.80/3.53)	0.00001
		A/G	872/370 (70.21/29.79)	1 043/205 (83.57/16.43)	0.00001
<i>PIK3R1</i> rs3730089 G>A	G	AA/AG/GG	230/257/134 (37.04/41.38/21.58)	270/269/85 (43.27/43.11/13.62)	0.0001
		A/G	717/525 (57.73/42.27)	809/439 (64.82/35.18)	0.0001
<i>MTOR</i> rs2295080 T>G	G	TT/TG/GG	220/304/97 (35.43/48.95/15.62)	218/318/88 (34.94/50.96/14.10)	0.686
		T/G	744/498 (59.90/40.10)	754/494 (60.42/39.58)	0.825
<i>MTOR</i> rs2536 T>C	C	TT/TC/CC	580/41/0 (93.40/6.60/0)	567/55/2 (90.87/8.81/0.32)	0.124
		T/C	1 201/41 (96.70/3.30)	1 189/59 (95.27/4.73)	0.087
<i>PTEN</i> rs701848 T>C	C	TT/CT/CC	156/324/141 (25.12/52.17/22.71)	212/306/106 (33.97/49.04/16.99)	0.0001
		T/C	636/606 (51.21/48.79)	730/518 (58.49/41.51)	0.0001
<i>PTEN</i> rs2735343 G>C	C	GG/GC/CC	169/355/97 (27.21/57.17/15.62)	217/280/127 (34.78/44.87/20.35)	0.0001
		G/C	693/549 (55.80/44.20)	714/534 (57.21/42.79)	0.52

Примечание. P – значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов (тест χ^2 на гомогенность выборок).

Таблица 2. Статистически значимые ассоциации полиморфных локусов генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов с ХОБЛ

Ген, локус	Редкий аллель	N	Генотип/модель	OR _{adj} (CI 95 %)	P _{adj}	P _{cor-FDR}		
<i>SIRT1</i> rs3818292 A>G	G	1245	AA	1.00	0.0066	0.0093		
			AG+GG доминантная	1.40 (1.10–1.78)				
			AA+GG	1.00			0.001	0.0024
			AG	1.51 (1.18–1.94)				
			лог-аддитивная	1.21 (0.99–1.49)				
<i>SIRT3</i> rs3782116 G>A	A	1245	G	1.19 (0.99–1.44)	0.059	0.062		
			GG	1.00	0.0055	0.008		
			GA+AA доминантная	0.69 (0.53–0.90)				
			AA+GG	1.00			0.0052	0.008
			AG	0.69 (0.53–1.90)				
лог-аддитивная	0.84 (0.7–1.00)							
<i>SIRT3</i> rs536715 G>A	A	1245	A	0.82 (0.69–0.96)	0.02	0.03		
			GG	1.00	0.00001	3.85e-05		
			GA+AA доминантная	0.50 (0.39–0.65)				
			AA+GG	1.00			0.00001	3.85e-05
			AG	0.48 (0.36–0.62)				
лог-аддитивная	0.66 (0.55–0.80)							
<i>SIRT6</i> rs107251 C>T	T	1245	A	0.63 (0.52–0.76)	0.00001	3.85e-05		
			CC	1.00	0.0005	0.0015		
			CT+TT доминантная	0.65 (0.51–0.83)				
			CC+TT	1.00			0.00001	3.85e-05
			CT	0.55 (0.42–0.71)				
лог-аддитивная	0.84 (0.70–1.00)							
<i>PIK3R1</i> rs10515070 T>A	A	1245	T	0.82 (0.68–0.97)	0.032	0.039		
			TT	1.00	0.0042	0.007		
			TA+AA доминантная	1.47 (1.13–1.92)				
			TT+AA	1.00			0.0023	0.0044
			TA	1.47 (1.15–1.88)				
лог-аддитивная	1.17 (0.98–1.41)							
<i>PIK3R1</i> rs831125 A>G	G	1245	A	1.15 (0.98–1.36)	0.077	0.088		
			AA	1.00	0.00001	3.85e-05		
			AG+GG доминантная	2.61 (1.99–3.42)				
			AA+GG	1.00			0.00001	3.85e-05
			AG	2.28 (1.73–3.00)				
лог-аддитивная	2.19 (1.74–2.75)							
<i>PIK3R1</i> rs3730089 G>A	G	1245	G	2.16 (1.78–2.62)	0.00001	3.85e-05		
			AA	1.00	0.037	0.045		
			AG+GG доминантная	1.30 (1.02–1.66)				
			AA+AG	1.00			0.0007	0.0018
			GG рецессивная	1.73 (1.26–2.39)				
лог-аддитивная	1.31 (1.11–1.55)							
<i>PTEN</i> rs701848 T>C	C	1245	G	1.35 (1.15–1.58)	0.0001	0.00033		
			TT	1.00	0.0035	0.006		
			TC+CC доминантная	1.52 (1.15–2.02)				
			TT+TC	1.00			0.028	0.036
			CC рецессивная	1.44 (1.04–1.99)				
лог-аддитивная	1.35 (1.12–1.63)							
<i>PTEN</i> rs2735343 G>C	C	1245	C	1.34 (1.14–1.57)	0.0001	0.00033		
			GG	1.00	0.01	0.013		
			GC+CC доминантная	1.42 (1.09–1.87)				
			GG+CC	1.00			0.0001	0.00033
			GC	1.64 (1.28–2.12)				
лог-аддитивная	1.06 (0.88–1.27)							
			C	1.06 (0.9–1.24)	0.52	0.522		

Примечание. N – количество индивидов, включенных в регрессионный анализ; P_{adj} – значимость для теста отношения правдоподобия лог-регрессионной модели с учетом возраста, пола, статуса и индекса курения; OR_{adj} – отношение шансов с учетом всех факторов; CI 95 % – 95 % доверительный интервал для OR; P_{cor-FDR} – значимость теста после коррекции FDR; 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).

Таблица 3. Ассоциация полиморфных вариантов генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов с показателями функции внешнего дыхания и индексом курения

Ген, локус	Генотипы	M ± SE	P	beta (CI 95 %)
Жизненная емкость легких (ЖЕЛ)				
<i>MTOR</i> rs2536 T>C	ТТ	53.76 (1.03)	0.013	0.00
	СТ	64.79 (4.02)		11.03 (2.38–19.67)
<i>PIK3R1</i> rs3730089 G>A	AA+GG	56.5 (1.31)	0.013	0.00
	AG	51.4 (1.51)		-5.10 (-9.09...-1.11)
<i>SIRT3</i> rs3782116 G>A	GG+AG	53.31 (1.1)	0.0015	0.00
	AA	62.59 (3.06)		9.28 (3.61–14.95)
Форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ)				
<i>SIRT1</i> rs3818292 A>G	AA	56.06 (1.45)	0.017	0.00
	AG+GG	51.06 (1.51)		-5.00 (-9.10...-0.90)
	AA+GG	55.52 (1.39)		0.00
	AG	51.35 (1.59)	0.04	-4.17 (-8.31...-0.03)
<i>MTOR</i> rs2295080 T>G	ТТ+GG	57.42 (1.61)	0.025	0.00
	GT	52.09 (1.75)		-5.34 (-9.99...-0.68)
<i>PIK3R1</i> rs3730089 G>A	AA+AG	53.15 (1.13)	0.0026	0.00
	GG	61.18 (2.57)		8.03 (2.83–13.23)
<i>SIRT3</i> rs3782116 G>A	GG+AG	54.6 (1.2)	0.0028	0.00
	AA	63.95 (3.23)		9.36 (3.27–5.45)
	GG+AA	58.28 (1.5)		0.00
	AG	52.61 (1.73)		-5.67 (-10.24...-1.10)
Индекс курения у курильщиков (пачки/лет)				
<i>PIK3R1</i> rs10515070 T>A	ТТ+AA	31.61 (1.3)	0.025	0.00
	AT	31.00 (1.11)		-3.30 (-6.17...-0.42)
<i>PIK3R1</i> rs831125 A>G	AA+GG	30.85 (1.08)	0.0082	0.00
	AG	32.48 (1.61)		-4.37 (-7.60...-1.14)
<i>SIRT1</i> rs3818292 A>G	AA	32.00 (1.13)	0.036	0.00
	AG+GG	31.03 (1.25)		-3.04 (-5.88...-0.20)

Примечание. M ± SE – средние значения и стандартная ошибка среднего; P – уровень значимости для уравнения регрессии; beta (CI 95 %) – коэффициент регрессии и 95 % доверительный интервал для коэффициента.

доминантной ($P_{adj} = 0.0035$, OR = 1.52), рецессивной ($P_{adj} = 0.028$, OR = 1.44) и лог-аддитивной ($P_{adj} = 0.0015$, OR = 1.35) моделях. Ассоциация локуса rs2735343 с ХОБЛ установлена в доминантной модели ($P_{adj} = 0.01$, OR = 1.42) и для гетерозиготного генотипа ($P_{adj} = 0.0001$, OR = 1.64). Неравновесие по сцеплению между локусами rs701848 и rs2735343 гена *PTEN* не выявлено ($D' = 0.234$, $r^2 = 0.035$), анализ ассоциации гаплотипов гена *PTEN* не проводили.

Ассоциация исследованных полиморфных локусов с показателями функции внешнего дыхания и индексом курения

Снижение показателей функции внешнего дыхания является ключевой клинической характеристикой обструкции дыхательных путей при ХОБЛ и указывает на прогрессирование заболевания. Проведен анализ вариабельности количественных показателей функции внешнего дыхания: жизненной емкости легких, форсированной жизненной емкости легких и объема форсированного выдоха в 1 с в зависимости от полиморфных вариантов изученных генов (табл. 3). Снижение показателя ЖЕЛ было ассоциировано с гетерозиготным генотипом гена *PIK3R1* (rs3730089) ($P = 0.013$), генотипом ТТ гена *MTOR*

(rs2536) ($P = 0.013$). Значимое увеличение ЖЕЛ установлено для носителей генотипа АА гена *SIRT3* (rs3782116) ($P = 0.0015$).

Высокие значения ФЖЕЛ наблюдались у носителей генотипов АА гена *SIRT1* (rs3818292) ($P = 0.017$), GG гена *PIK3R1* (rs3730089) ($P = 0.025$) и АА гена *SIRT3* (rs3782116) ($P = 0.0028$). Тогда как для индивидов с гетерозиготными генотипами генов *SIRT1* (rs3818292) ($P = 0.04$), *MTOR* (rs2295080) ($P = 0.025$) и *SIRT3* (rs3782116) ($P = 0.016$) отмечено снижение данного показателя (см. табл. 3). Увеличение индекса курения, характеризующего интенсивность и стаж курения (индекс курения, в пачках/лет), установлено у носителей гетерозиготного генотипа гена *PIK3R1* (rs831125) ($P = 0.0082$) и генотипа АА гена *SIRT1* (rs3818292) ($P = 0.036$).

Анализ ген-генных комбинаций

Проведен поиск информативных ген-генных комбинаций с использованием программы APSampler, идентифицированы сочетания аллелей и генотипов, ассоциированных с ХОБЛ. В анализ включали локус *SIRT2* (rs10410544), исследованный нами ранее (Korytina et al., 2019). Выявлено 2324 паттерна, ассоциированных с ХОБЛ. В табл. 4 пред-

Таблица 4. Ген-генные комбинации полиморфных локусов генов PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада и сиртуинов, значимо ассоциированные с развитием ХОБЛ

Комбинации	ХОБЛ (частота)	Контроль (частота)	<i>P</i>	<i>P</i> _{FDR}	OR	CI (95 %)
Рисковые						
<i>PIK3R1</i> (rs831125) G + <i>SIRT3</i> (rs536715) GG	0.36	0.12	1.06e-14	2.45e-11	3.45	2.49–4.78
<i>PIK3R1</i> (rs831125) G + <i>MTOR</i> (rs2536) T	0.53	0.29	7.65e-13	1.77e-09	2.71	2.05–3.57
<i>PIK3R1</i> (rs831125) G + <i>PTEN</i> (rs2735343) C	0.39	0.17	7.7e-13	1.79e-09	3.06	2.23–4.18
<i>PIK3R1</i> (rs831125) GA + <i>SIRT3</i> (rs536715) G + <i>PTEN</i> (rs2735343) C	0.31	0.14	9.07e-10	2.10e-06	2.86	2.02–4.04
<i>SIRT3</i> (rs536715) GG + <i>PTEN</i> (rs2735343) CG	0.61	0.42	2.98e-09	6.92e-06	2.17	1.67–2.83
<i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>SIRT3</i> (rs536715) GG	0.46	0.29	1.14e-08	2.64e-05	2.09	1.62–2.72
<i>PIK3R1</i> (rs3730089) G + <i>SIRT6</i> (rs107251) CC	0.45	0.29	4.13e-08	9.60e-05	2.01	1.56–2.59
<i>PIK3R1</i> (rs10515070) A + <i>PTEN</i> (rs701848) C + <i>PTEN</i> (rs2735343) C	0.39	0.23	1.11e-06	0.0025	2.10	1.54–2.85
Протективные						
<i>PIK3R1</i> (rs831125) AA + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) A	0.34	0.61	1.11e-16	2.58e-13	0.32	0.24–0.42
<i>PIK3R1</i> (rs831125) A + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) A + <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A	0.03	0.22	2.7e-15	6.27e-12	0.13	0.07–0.24
<i>PIK3R1</i> (rs831125) A + <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A	0.06	0.25	1.07e-14	2.49e-11	0.18	0.11–0.29
<i>PIK3R1</i> (rs831125) A + <i>PIK3R1</i> (rs3730089) A + <i>SIRT3</i> (rs3782116) AG + <i>SIRT3</i> (rs536715) A	0.02	0.17	3.82e-14	8.87e-11	0.09	0.04–0.20
<i>PIK3R1</i> (rs3730089) A + <i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A	0.06	0.22	2.3e-13	5.36e-10	0.21	0.13–0.32
<i>SIRT3</i> (rs3782116) A + <i>SIRT3</i> (rs536715) A	0.08	0.26	6.52e-13	1.52e-09	0.25	0.17–0.38
<i>SIRT3</i> (rs3782116) AG + <i>SIRT3</i> (rs536715) GA	0.04	0.18	4.0e-11	9.29e-08	0.20	0.12–0.35
<i>SIRT3</i> (rs536715) A + <i>SIRT6</i> (rs107251) T	0.10	0.25	8.12e-11	1.89e-07	0.33	0.23–0.47
<i>SIRT3</i> (rs536715) A + <i>PTEN</i> (rs2735343) GG	0.06	0.18	4.73e-09	1.09e-05	0.27	0.17–0.44
<i>SIRT3</i> (rs536715) GA + <i>SIRT6</i> (rs107251) TC	0.06	0.17	9.75e-09	2.26e-05	0.30	0.19–0.47

Примечание. *P*-value – уровень значимости по тесту Фишера; *P*_{FDR} – значимость теста после коррекции FDR; OR – отношение шансов; 95 % CI – 95 % доверительный интервал для OR.

ставлены результаты наиболее значимых ген-генных сочетаний с *P*_{FDR} менее 0.05 и OR более 2.0 для комбинаций риска или OR менее 0.35 – для протективных комбинаций. Всего было найдено 19 ген-генных комбинаций, которые соответствовали выбранному критерию, из них 9 ассоциировали с риском развития ХОБЛ, 10 были протективными. Большинство выявленных комбинаций риска включали аллель G или генотип GA гена *PIK3R1* (rs831125) (четыре информативных сочетания).

Наибольший риск развития ХОБЛ определялся сочетанием данных вариантов гена *PIK3R1* (rs831125) с генотипом GG гена *SIRT3* (rs536715) (OR = 3.45); аллеля C гена *PTEN* (rs2735343) (OR = 3.06) и их комбинацией – генотип GA гена *PIK3R1* (rs831125), аллель G гена *SIRT3* (rs536715) и аллель C гена *PTEN* (rs2735343) (OR = 2.86). Анализ ген-генных сочетаний исследованных полиморфных локусов позволил обнаружить ассоциацию аллеля T гена *MTOR* (rs2536), который проявлял свой эффект только в комбинации с аллелем G гена *PIK3R1* (rs831125) (OR = 2.71). Три из найденных комбинаций включали аллель G гена *PIK3R1* (rs3730089) в сочетании с генотипом GG гена *SIRT3* (rs536715) (OR = 2.09) либо с генотипом CC гена *SIRT6* (rs107251) (OR = 2.01).

Наиболее значимые комбинации, которые ассоциировали с пониженным риском развития ХОБЛ, включали аллель A или генотип AA гена *PIK3R1* (rs831125) и аллель A гена *PIK3R1* (rs3730089) в сочетании с аллелем A или генотипом AG гена *SIRT3* (rs3782116) и аллелем A локуса *SIRT3* (rs536715) (см. табл. 4). Таким образом, полиморфные локусы *PIK3R1* (rs831125), *PIK3R1* (rs3730089), *SIRT3* (rs536715) проявляли аллель-специфическое действие, когда аллель G гена *PIK3R1* (rs831125), аллель G гена *PIK3R1* (rs3730089) и аллель G и генотип GG гена *SIRT3* (rs536715) были частью комбинаций, предрасполагающей к развитию ХОБЛ, а альтернативные аллели этих же полиморфных локусов присутствовали в комбинациях, связанных со сниженным риском заболевания.

Обсуждение

В результате проведенного исследования установлены значимые ассоциации полиморфных вариантов генов *SIRT1* (rs3818292), *SIRT3* (rs3782116, rs536715), *SIRT6* (rs107251) с развитием ХОБЛ. Белок SIRT1 является наиболее изученным членом семейства сиртуинов млекопитающих. Показано, что SIRT1 играет важную роль в сигнальных путях, вовлеченных в клеточное старение и гибель клеток

(Finkel et al., 2009). Он деацетилюет многие ключевые регуляторные белки и факторы транскрипции, участвующие в репарации ДНК, воспалении, экспрессии антиоксидантных генов и клеточном старении, включая гены PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути, транскрипционный фактор FOXO3a, белки p21, p16, Klotho (Cao et al., 2013).

Увеличение экспрессии SIRT1 ингибирует TGF- β 1/SMAD3-сигнальный каскад и ослабляет эпителиально-мезенхимальную трансформацию, что приводит к снижению уровня ремоделирования дыхательных путей при ХОБЛ (Zhang et al., 2022). Уровень SIRT1 снижен в периферических легочных и циркулирующих мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с ХОБЛ (Rajendrasozhan et al., 2008).

Нами установлено, что риск развития ХОБЛ выше у гетерозиготных носителей локуса *SIRT1* (rs3818292). Более того, этот же полиморфный вариант был связан со снижением показателя ФЖЕЛ, отражающего прогрессирование заболевания. Функциональный анализ показал, что *SIRT1* (rs3818292) находится в сцеплении с полиморфным локусом в 5'-нетранслируемом регионе ДНК (rs3740051), изменяющим сайт связывания для транскрипционного фактора NF κ B. Нами не выявлено ассоциации полиморфного локуса rs3758391 гена *SIRT1* с развитием ХОБЛ, что согласуется с данными, полученными для популяции китайцев Хань (Gao et al., 2018). По данным функционального анализа, rs3758391 находится в промоторной области гена *SIRT1*, вариант С нарушает сайты связывания для нескольких транскрипционных факторов и регуляторных белков, влияя на экспрессию гена. Известна роль rs3758391 в развитии целого комплекса возраст-ассоциированных заболеваний (Wu et al., 2022).

Митохондриальная дисфункция в эпителиальных клетках респираторных путей играет важную роль в патогенезе ХОБЛ (Zhang et al., 2022). Белок SIRT3 является основной митохондриальной деацетилазой, регулирующей работу многих ферментов, вовлеченных в энергетический метаболизм, компоненты дыхательной цепи, цикл трикарбоновых кислот, кетогенез и бета-окисление жирных кислот (Wu et al., 2022).

Белок SIRT3 может напрямую контролировать продукцию активированных форм кислорода, деацетилируя марганцевую супероксиддисмутазу (SOD2), основной митохондриальный антиоксидантный фермент (Dikalova et al., 2017). Он участвует в регуляции работы фермента репарации ДНК OGG1, что приводит к увеличению повреждения мтДНК и апоптозу альвеолярных эпителиальных клеток (Sun et al., 2018). Ряд исследований показал вклад SIRT3 в развитие различных многофакторных заболеваний (Wu et al., 2022).

Нами изучена ассоциация двух функциональных полиморфизмов гена *SIRT3* (rs3782116 и rs536715) с ХОБЛ. Функциональный анализ продемонстрировал, что rs3782116 локализован в области сайтов связывания с миРНК hsa-miR-328; полиморфные локусы rs3782116 и rs536715 располагаются в регионах ДНК, связывающихся с регуляторными белками. Ассоциация с ХОБЛ в нашей выборке установлена для обоих полиморфных локусов; риск развития заболевания был связан с частыми аллелями G локусов rs3782116 и rs536715. Необходимо отметить,

что гомозиготные носители редкого аллеля А полиморфного локуса rs3782116 гена *SIRT3* имели более высокие показатели ЖЕЛ и ФЖЕЛ. Ранее исследования полиморфных локусов гена *SIRT3* при ХОБЛ не проводили, в то же время имеются данные по ассоциации полиморфных локусов гена *SIRT3* с заболеваниями, в патогенезе которых окислительный стресс и клеточное старение играют ключевую роль (Song et al., 2022).

Нами получены значимые ассоциации локуса *SIRT6* (rs107251) с развитием ХОБЛ; частый аллель С является маркером риска ХОБЛ, в то время как гетерозиготный генотип маркирует устойчивость к заболеванию. Исследованный нами полиморфный локус rs107251 расположен в регионе ДНК, связывающемся с регуляторным белком SOX8, и находится в тесном сцеплении с rs350846, локализованным в 3'-нетранслируемом регионе гена *SIRT6*, сайте связывания для нескольких миРНК (hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-24, hsa-miR-34a, hsa-miR-644, hsa-miR-940). Белок SIRT6 участвует в регуляции стабильности генома, NF- κ B сигналинга и гомеостаза глюкозы, проявляет активность АДФ-рибозилтрансферазы и гистондеацетилазы, играет роль в репарации ДНК и поддержании целостности теломерного хроматина (Kugel, Mostoslavsky, 2014). В работе (Takasaka et al., 2014) показано снижение уровня SIRT6 в эпителиальных клетках дыхательных путей пациентов с ХОБЛ, вызванное воздействием сигаретного дыма, что приводит к клеточному старению и нарушению процессов аутофагии. Ранее полиморфные локусы гена *SIRT6* при ХОБЛ не исследовали, однако имеются данные по ассоциации с сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые часто являются коморбидной патологией при ХОБЛ (Song et al., 2022).

Ген *PIK3R1* кодирует регуляторную субъединицу 1 фосфоинозитид-3 киназы, ключевого элемента PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада (Ersahin et al., 2015). Нами исследованы три полиморфных локуса гена *PIK3R1*, rs10515070, rs831125, rs3730089, которые показали значимую ассоциацию с развитием ХОБЛ в нашей выборке. Носители редких аллелей данных полиморфных локусов имели высокий риск развития заболевания. Кроме того, нами обнаружена вариабельность показателей ЖЕЛ и ФЖЕЛ в зависимости от генотипов локуса rs3730089; так, у гетерозигот установлены более низкие показатели, что согласуется с результатами анализа ассоциации с развитием заболевания. Функциональный анализ показал, что интронный вариант rs831125 локализован в сайте связывания регуляторных белков; rs3730089 является миссенс-вариантом с «мягким» (benign) эффектом, согласно базе PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), находится в участке связывания с регуляторными белками и влияет на сайты сплайсинга. Исследований, посвященных анализу ассоциации гена *PIK3R1* с развитием ХОБЛ, ранее не проводилось. Имеются данные по ассоциации rs3730089 с сахарным диабетом 2-го типа (Karadoğan et al., 2018).

Фосфатаза PTEN регулирует активность фосфоинозитид-3 киназы (PI3K) (Worby, Dixon, 2014). Курение как основной фактор риска ХОБЛ провоцирует развитие окислительного стресса, который в свою очередь влияет на экспрессию PTEN (Cai et al., 2022). Нами исследованы

два функциональных полиморфных локуса гена *PTEN*; rs70184 локализован в 3'-области гена *PTEN* и изменяет сайты связывания для мРНК hsa-miR-1252 и hsa-miR-1304; rs2735343, находясь в интронной области, влияет на сайты связывания для нескольких регуляторных белков.

Значимые ассоциации с ХОБЛ в нашей выборке выявлены с локусами гена *PTEN*; так, у гомозиготных носителей редкого аллеля С локуса rs701848 и гетерозиготных носителей по локусу rs2735343 риск развития ХОБЛ был существенно выше.

Опубликованы данные по ассоциации локуса rs701848 гена *PTEN* с развитием ХОБЛ; риск был значительно снижен для гомозиготных носителей аллеля Т, что согласуется с данными, полученными для нашей выборки (Hosgood et al., 2009). *PTEN* участвует в регуляции различных биологических процессов, включая пролиферацию клеток, апоптоз, воспалительные реакции, транскрипцию и геномную стабильность (Cai et al., 2022). Снижение уровня *PTEN* приводит к активации PI3K-сигналинга и усилению клеточного старения при ХОБЛ (Barnes et al., 2019). Показано, что снижение активности *PTEN* при ХОБЛ увеличивает активность матриксной металлопротеазы MMP9 в клетках бронхиального эпителия, что в результате способствует прогрессированию воспаления и деградации внеклеточного матрикса (Vannitamby et al., 2017).

Проведение анализа ген-генных сочетаний позволило выявить наличие значительного синергизма между полиморфными локусами генов, кодирующих фосфоинозитид-3-киназу (PIK3R1) и митохондриальную деацетилазу (*SIRT3*), входящие в большинство значимых комбинаций, ассоциированных с повышенным риском развития ХОБЛ. Аллель С гена *PTEN* (rs2735343) был в составе четырех информативных комбинаций, ассоциированных с высоким риском хронической обструктивной болезни легких.

Полученные результаты полигенного анализа указывают на взаимодействие генов, кодирующих сиртуины *SIRT3*, *SIRT2*, *SIRT6* и *PI3KRI*, *PTEN*, *MTOR*, и находят подтверждение в функциональной взаимосвязи сиртуинов и PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада.

Заключение

В результате проведенного исследования впервые в нашей работе показаны значимая ассоциация генов *SIRT3* (rs3782116, rs536715), *SIRT6* (rs107251) и *PIK3R1* (rs10515070, rs831125, rs3730089) с ХОБЛ и наличие межгенных взаимодействий генов, кодирующих ключевые компоненты PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскада, и сиртуинов. Это подтверждает предположение о существенной роли механизмов клеточного старения в формировании предрасположенности к хронической обструктивной болезни легких.

Список литературы / References

Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Лещенко И.В., Овчаренко С.И., Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению. *Пульмонология*. 2022;32(3):356-392. DOI 10.18093/0869-0189-2022-32-3-356-392.

- [Chuchalin A.G., Avdeev S.N., Aisanov Z.R., Belevskiy A.S., Leshchenko I.V., Ovcharenko S.I., Shmelev E.I. Federal guidelines on diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya = Pulmonology*. 2022;32(3):356-392. DOI 10.18093/0869-0189-2022-32-3-356-392. (in Russian)]
- Barnes P.J., Baker J., Donnelly L.E. Cellular senescence as a mechanism and target in chronic lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2019;200(5):556-564. DOI 10.1164/rccm.201810-1975TR.
- Cai B., Yang L., Do Jung Y., Zhang Y., Liu X., Zhao P., Li J. *PTEN*: An emerging potential target for therapeutic intervention in respiratory diseases. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2022;2022:4512503. DOI 10.1155/2022/4512503.
- Cao L., Liu C., Wang F., Wang H. *SIRT1* negatively regulates amyloid-beta-induced inflammation via the NF- κ B pathway. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2013;46(8):659-669. DOI 10.1590/1414-431X20132903.
- Dikalova A.E., Itani H.A., Nazarewicz R.R., McMaster W.G., Flynn C.R., Uzhachenko R., Fessel J.P., Gamboa J.L., Harrison D.G., Dikalov S.I. *Sirt3* impairment and *SOD2* hyperacetylation in vascular oxidative stress and hypertension. *Circ. Res*. 2017;121(5):564-574. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.117.310933.
- Ersahin T., Tuncbag N., Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst*. 2015;11(7):1946-1954. DOI 10.1039/c5mb00101c.
- Finkel T., Deng C.X., Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 2009;460(7255):587-591. DOI 10.1038/nature08197.
- Gao S.L., Wang Y.H., Li C.Y., Yang L.W., Zou B.A., Chen Z.G., Yao W.M., Song Z.Q., Cheng J.F., Lin Z.Y., Liu G. A highly significant association between Cathepsin S gene polymorphisms rs12068264 and chronic obstructive pulmonary disease susceptibility in Han Chinese population. *Biosci. Rep*. 2018;38(4):BSR20180410. DOI 10.1042/BSR20180410.
- Hosgood H.D., Menashe I., He X., Chanock S., Lan Q. *PTEN* identified as important risk factor of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med*. 2009;103(12):1866-1870. DOI 10.1016/j.rmed.2009.06.016.
- Ito K., Barnes P.J. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*. 2009;135(1):173-180. DOI 10.1378/chest.08-1419.
- Karadoğan A.H., Arikoglu H., Göktürk F., İşçiöglu F., İpekçi S.H. *PIK3R1* gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes and related features in the Turkish population. *Adv. Clin. Exp. Med*. 2018;27(7):921-927. DOI 10.17219/acem/68985.
- Kirkham P.A., Barnes P.J. Oxidative stress in COPD. *Chest*. 2013;144(1):266-273. DOI 10.1378/chest.12-2664.
- Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Aznabaeva Y.G., Kochetova O.V., Zagidullin N.S., Kzhyshkowska J.G., Zagidullin S.Z., Viktorova T.V. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Gene*. 2019;692:102-112. DOI 10.1016/j.gene.2018.12.061.
- Kugel S., Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for *SIRT6*. *Trends Biochem. Sci*. 2014;39(2):72-81. DOI 10.1016/j.tibs.2013.12.002.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet*. 2007;81(3):559-575. DOI 10.1086/519795.
- Ragland M.F., Benway C.J., Lutz S.M., Bowler R.P., Hecker J., Hokanson J.E., Crapo J.D., Castaldi P.J., DeMeo D.L., Hersh C.P., Hobbs B.D., Lange C., Beaty T.H., Cho M.H., Silverman E.K. Genetic advances in chronic obstructive pulmonary disease. Insights from COPDGene. *Am J. Respir. Crit. Care Med*. 2019;200(6):677-690. DOI 10.1164/rccm.201808-1455SO.
- Rajendrasozhan S., Yang S.R., Kinnula V.L., Rahman I. *SIRT1*, an anti-inflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2008;177(8):861-870. DOI 10.1164/rccm.200708-1269OC.

- Ryter S.W., Rosas I.O., Owen C.A., Martinez F.J., Choi M.E., Lee C.G., Elias J.A., Choi A.M.K. Mitochondrial dysfunction as a pathogenic mediator of chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2018;15(Suppl. 4):S266-S272. DOI 10.1513/AnnalsATS.201808-585MG.
- Song X., Wang H., Wang C., Ji G., Jiang P., Liang D., Wang X. Association of sirtuin gene polymorphisms with susceptibility to coronary artery disease in a North Chinese population. *Biomed. Res. Int.* 2022;2022:4294008. DOI 10.1155/2022/4294008.
- Sun W., Liu C., Chen Q., Liu N., Yan Y., Liu B. SIRT3: A new regulator of cardiovascular diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018;2018:7293861. DOI 10.1155/2018/7293861.
- Takasaka N., Araya J., Hara H., Ito S., Kobayashi K., Kurita Y., Wakui H., Yoshii Y., Yumino Y., Fujii S., Minagawa S., Tsurushige C., Kojima J., Numata T., Shimizu K., Kawaishi M., Kaneko Y., Kamiya N., Hirano J., Odaka M., Morikawa T., Nishimura S.L., Nakayama K., Kuwano K. Autophagy induction by SIRT6 through attenuation of insulin-like growth factor signaling is involved in the regulation of human bronchial epithelial cell senescence. *J. Immunol.* 2014;192(3):958-968. DOI 10.4049/jimmunol.1302341.
- Vannitamby A., Seow H.J., Anderson G., Vlahos R., Thompson M., Steinfert D., Irving L.B., Bozinovski S. Tumour-associated neutrophils and loss of epithelial PTEN can promote corticosteroid-insensitive MMP-9 expression in the chronically inflamed lung microenvironment. *Thorax.* 2017;72(12):1140-1143. DOI 10.1136/thoraxjnl-2016-209389.
- Wang C.H., Wu S.B., Wu Y.T., Wei Y.H. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp. Biol. Med.* 2013;238(5):450-460. DOI 10.1177/1535370213493069.
- 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. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D877-D881. DOI 10.1093/nar/gkv1340.
- Worby C.A., Dixon J.E. PTEN. *Annu. Rev. Biochem.* 2014;83:641-669. DOI 10.1146/annurev-biochem-082411-113907.
- Wu Q.J., Zhang T.N., Chen H.H., Yu X.F., Lv J.L., Liu Y.Y., Liu Y.S., Zheng G., Zhao J.Q., Wei Y.F., Guo J.Y., Liu F.H., Chang Q., Zhang Y.X., Liu C.G., Zhao Y.H. The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022;7(1):402. DOI 10.1038/s41392-022-01257-8.
- Zhang X.Y., Li W., Zhang J.R., Li C.Y., Zhang J., Lv X.J. Roles of sirtuin family members in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* 2022; 23(1):66. DOI 10.1186/s12931-022-01986-y.

ORCID ID

G.F. Korytina orcid.org/0000-0002-1695-5173
L.Z. Akhmadishina orcid.org/0000-0003-0043-5090
V.A. Markelov orcid.org/0000-0002-0663-7219
Y.G. Aznabaeva orcid.org/0000-0002-1518-774X
O.V. Kochetova orcid.org/0000-0002-2944-4428

T.R. Nasibullin orcid.org/0000-0001-8823-8678
A.P. Larkina orcid.org/0009-0003-0710-6705
N.N. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-4127-078X
N.Sh. Zagidullin orcid.org/0000-0003-2386-6707
T.V. Victorova orcid.org/0000-0001-8900-2480

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00019 (<https://rscf.ru/project/23-25-00019/>) с использованием оборудования ЦКП «Биомика» и комплекса оборудования для исследования нуклеиновых кислот «КОДИНК» (УНУ «КОДИНК») (ИБГ УФИЦ РАН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.03.2023. После доработки 19.04.2023. Принята к публикации 19.04.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, методами полногеномного секвенирования и машинного обучения

Д.Е. Иваношук^{1, 3}✉, А.Б. Колкер², О.В. Тимошенко¹, С.Е. Семаев^{1, 3}, Е.В. Шахтшнейдер^{1, 3}

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ dinara2084@mail.ru

Аннотация. Одним из наиболее распространенных врожденных метаболических нарушений является семейная гиперхолестеринемия. Это заболевание приводит к раннему развитию сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза. Семейная гиперхолестеринемия относится к моногенным заболеваниям с преимущественно аутосомно-доминантным типом наследования. Редкие патогенные варианты в гене *LDLR* определяются в 75–85 % случаев у пациентов с выявленной молекулярно-генетической причиной заболевания, варианты в других генах встречаются с частотой менее 5 % (*APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8* и др.). Отрицательный результат генетического скрининга патогенных вариантов генов рецептора липопротеинов низкой плотности и его лигандов не исключает диагноз «семейная гиперхолестеринемия». В 20–40 % случаев при молекулярно-генетическом исследовании не удается определить изменения в вышеназванных генах. Цель настоящей работы – поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, с использованием современных высокотехнологичных методов секвенирования и машинного обучения. На основании выборки пациентов с семейной гиперхолестеринемией, сформированной по критериям Dutch Lipid Clinic Network и включающей случаи заболевания, подтвержденные молекулярно-генетическим анализом, построены решающие деревья, которые позволили выделить из выборки случаи, требующие дополнительного молекулярно-генетического анализа. Определены пять пробандов с наиболее тяжелым течением семейной гиперхолестеринемии без патогенных вариантов в изученных генах для проведения полногеномного секвенирования на платформе HiSeq 1500 (Illumina). При выполнении полногеномного секвенирования у трех из пяти обследованных пациентов найдены редкие варианты: гетерозиготный вариант (rs760657350), локализованный в акцепторном сайте сплайсинга гена *PLD1*: с.2430-1G>A, ранее не описанная однонуклеотидная делеция гена *SIDT1*: с.2426del (p.Leu809CysfsTer2), новый миссенс-вариант с.10313C>G (p.Pro3438Arg) гена *LRP1B* и вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: с.165del (p.Ser56AlafsTer11) гена *CETP*. Все варианты впервые описаны у пробандов с клиническим диагнозом «семейная гиперхолестеринемия». Идентифицированы варианты, которые потенциально могут влиять на формирование фенотипа семейной гиперхолестеринемии.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; полногеномное секвенирование; машинное обучение; *SIDT1*; *LRP1B*; *PLD1*; *CETP*.

Для цитирования: Иваношук Д.Е., Колкер А.Б., Тимошенко О.В., Семаев С.Е., Шахтшнейдер Е.В. Поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, методами полногеномного секвенирования и машинного обучения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):522-529. DOI 10.18699/VJGB-23-63

Searching for new genes associated with the familial hypercholesterolemia phenotype using whole-genome sequencing and machine learning

D.E. Ivanoshchuk^{1, 3}✉, A.B. Kolker², O.V. Timoshchenko¹, S.E. Semaev^{1, 3}, E.V. Shakhtshneider^{1, 3}

¹ Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ dinara2084@mail.ru

Abstract. One of the most common congenital metabolic disorders is familial hypercholesterolemia. Familial hypercholesterolemia is a condition caused by a type of genetic defect leading to a decreased rate of removal of low-density lipoproteins from the bloodstream and a pronounced increase in the blood level of total cholesterol. This disease leads to the early development of cardiovascular diseases of atherosclerotic etiology. Familial hypercholesterolemia is

a monogenic disease that is predominantly autosomal dominant. Rare pathogenic variants in the *LDLR* gene are present in 75–85 % of cases with an identified molecular genetic cause of the disease, and variants in other genes (*APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, and others) occur at a frequency of < 5 % in this group of patients. A negative result of genetic screening for pathogenic variants in genes of the low-density lipoprotein receptor and its ligands does not rule out a diagnosis of familial hypercholesterolemia. In 20–40 % of cases, molecular genetic testing fails to detect changes in the above genes. The aim of this work was to search for new genes associated with the familial hypercholesterolemia phenotype by modern high-tech methods of sequencing and machine learning. On the basis of a group of patients with familial hypercholesterolemia (enrolled according to the Dutch Lipid Clinic Network Criteria and including cases confirmed by molecular genetic analysis), decision trees were constructed, which made it possible to identify cases in the study population that require additional molecular genetic analysis. Five probands were identified as having the severest familial hypercholesterolemia without pathogenic variants in the studied genes and were analyzed by whole-genome sequencing on the HiSeq 1500 platform (Illumina). The whole-genome sequencing revealed rare variants in three out of five analyzed patients: a heterozygous variant (rs760657350) located in a splicing acceptor site in the *PLD1* gene (c.2430-1G>A), a previously undescribed single-nucleotide deletion in the *SIDT1* gene [c.2426del (p.Leu809CysfsTer2)], new missense variant c.10313C>G (p.Pro3438Arg) in the *LRP1B* gene, and single-nucleotide deletion variant rs753876598 [c.165del (p.Ser56AlafsTer11)] in the *CETP* gene. All these variants were found for the first time in patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. Variants were identified that may influence the formation of the familial hypercholesterolemia phenotype.

Key words: familial hypercholesterolemia; whole-genome sequencing; machine learning; *SIDT1*; *LRP1B*; *PLD1*; *CETP*.

For citation: Ivanoshchuk D.E., Kolker A.B., Timoshchenko O.V., Semaev S.E., Shakhshneider E.V. Searching for new genes associated with the familial hypercholesterolemia phenotype using whole-genome sequencing and machine learning. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):522-529. DOI 10.18699/VJGB-23-63

Введение

Одним из наиболее распространенных врожденных метаболических нарушений является семейная гиперхолестеринемия (СГХС) (Ежов и др., 2019). Это заболевание приводит к раннему развитию сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического генеза (Wiegman et al., 2015; Santos et al., 2016; Borén et al., 2020). Семейная гиперхолестеринемия относится к моногенным заболеваниям с преимущественно аутосомно-доминантным типом наследования (Ежов и др., 2019).

Редкие патогенные варианты в гене *LDLR* определяют в 75–85 % случаев у пациентов с установленной молекулярно-генетической причиной заболевания, варианты в других генах встречаются у таких пациентов с частотой менее 5 % (*APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8* и др.) (Nordestgaard et al., 2013; Iacocca, Hegele, 2017; Vasilyev et al., 2020). Пациенты могут быть гомозиготными или гетерозиготными носителями патогенных вариантов, что определяет тяжесть заболевания и возраст начала проявлений сердечно-сосудистых осложнений (Vaezi, Amini, 2022). Отрицательный результат генетического скрининга патогенных вариантов не исключает СГХС. В 20–40 % случаев при молекулярно-генетическом исследовании не удается определить изменения в вышеуказанных генах. Риск развития ишемической болезни сердца среди пациентов с СГХС увеличивается в 20 раз при отсутствии лечения (Khera et al., 2016), поэтому актуален поиск новых подходов к выявлению пациентов на ранних стадиях развития этого заболевания и оценке предрасположенности к нему в семьях пациентов.

Для поиска новых случаев в одном из исследований был предложен классификатор для идентификации потенциальных пациентов с СГХС с применением данных электронной медицинской карты. При использовании данных пациентов с подтвержденной СГХС ($n = 197$) и случаев без СГХС ($n = 6590$) был обучен классификатор решающих деревьев. Классификатор получил положительное про-

гностическое значение (PPV) 0.88 и чувствительность 0.75 при длительном тестировании. Этот классификатор был эффективен при поиске пациентов-кандидатов для дальнейшего скрининга СГХС. Такие стратегии, управляемые машинным обучением, могут привести к эффективному выявлению пациентов с наибольшим риском заболевания (Banda et al., 2019).

Цель работы – поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, с применением современных высокотехнологичных методов секвенирования и машинного обучения.

Материалы и методы

Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией (МКБ10 E78.0, E78.2, $n = 102$) сформирована в клинико-диагностическом отделении Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины (НИИТПМ) – филиала ИЦиГ СО РАН. Исследование было одобрено Этическим комитетом НИИТПМ (№ 68 от 04.06.2019). От каждого участника исследования получено информированное согласие. Диагноз СГХС был поставлен с помощью клинических липидных критериев Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) (WHO-Human genetics DoNDP..., 1999). Согласно этим критериям, для пациентов с СГХС осуществлена балльная оценка (Приложение)¹. Проведены клиническое обследование пациентов, ультразвуковая диагностика, выполнен забор крови для биохимического (липидный профиль, показатели общей биохимии) и молекулярно-генетического исследований.

Пробы крови для биохимических исследований забирала однократно из локтевой вены утром натощак через 12 ч после приема пищи. Уровни общего холестерина сыворотки, триглицеридов, холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП) и холестерина высокой плотности (ХС-ЛВП), а также глюкозы в крови определяли

¹ Приложение см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx19.pdf>

энзиматическими методами на автоматическом биохимическом анализаторе KoneLab300i (Финляндия) с использованием реактивов ThermoFisher (Финляндия). ХС-ЛНП рассчитывали по формуле Фридвальда, при ХС-ЛНП более 4.5 ммоль/л применяли метод прямого определения ХС-ЛНП. Статистическую обработку результатов выполняли в программе SPSS for Windows 23.0.

Для выделения ДНК из крови применяли метод фенол-хлороформной экстракции (Sambrook, Russell, 2006). Качество извлеченной ДНК оценено с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., США).

Выполнено таргетное секвенирование ДНК пациентов с СГХС с использованием системы NimbleGen SeqCap Target Enrichment System (Roche, Базель, Швейцария) на платформе MiSeq (Illumina, Калифорния, США). Авторская панель включала 43 гена: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *CETP*, *LPL*, *HMGCR*, *NPC1L1*, *PPARA*, *MTTP*, *LMF1*, *SAR1B*, *ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5*, *APOA1*, *APOA5*, *APOC2*, *APOE*, *LCAT*, *ANGPTL3*, *LIPC*, *APOA4*, *APOC3*, *SREBF1*, *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *POLD1*, *LPA*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6*, *SMAD7*, *SMAD9*, *LIPG*.

На следующем этапе исследования была сформирована выборка из 42 пациентов с СГХС без патогенных вариантов в изученных генах, которым выполнена мультиплексная лигазозависимая амплификация (MLPA) для определения структурных изменений (делеции, дубликации) промотора и экзонов гена *LDLR* с помощью набора SALSА MLPA KIT P062 (MRCHolland, Амстердам, Нидерланды).

На основании выборки семейной гиперхолестеринемии, сформированной по критериям DLCN и включающей случаи заболевания, подтвержденные молекулярно-генетическим анализом, построены решающие деревья, которые позволили выделить из выборки случаи, требующие дополнительного молекулярно-генетического анализа. Разработана программа на языке Python 3.9, предназначенная для построения ансамбля решающих правил для прогнозирования СГХС на базе машинного обучения в условиях ограниченной обучающей выборки. Решающие правила сохранялись в виде представления данных языка разметки для прогнозного моделирования (Predictive Model Markup Language). Решающие правила были построены на основе размеченной базы данных пациентов с диагнозом СГХС (Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2023660511, 2.05.2023).

С применением методов машинного обучения определены пять пробандов с наиболее тяжелым течением СГХС без патогенных вариантов в изученных генах для выполнения полногеномного секвенирования на платформе HiSeq 1500 (Illumina). Автоматизированную обработку и аннотирование полученных данных секвенирования проводили на платформе NGS Wizard (genomenal.ru). Потенциальный эффект влияния новых миссенс-вариантов на функцию/структуру белка оценивали с помощью данных инструментов прогнозирования *in silico*: CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/snv/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) и MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>), а также данных о частоте этих вариантов в популяциях, согласно gnomAD. Таким обра-

зом, были отобраны варианты в генах, ассоциированных с метаболизмом липидов, приводящие к потере функции белка, и миссенс-варианты с частотой менее 0.01 %. Патогенность новых вариантов оценивали в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии (ACMG) (Richards et al., 2015). Анализ сетей белок-белковых взаимодействий выполняли в STRING (Szklarczyk et al., 2019).

Результаты

Методами таргетного секвенирования и MLPA определены «патогенные» и «вероятно патогенные» варианты у 47.5 % обследованных пробандов и у 85.7 % детей пробандов. Варианты в гене *LDLR* у пациентов с фенотипом СГХС, которые были выявлены в нашем исследовании, приведены в табл. 1. Все миссенс-варианты представлены в гетерозиготной форме. Варианты Cys352Tyr, Cys340Phe и Leu401His ранее описаны у пациентов с СГХС в России (Zakharova et al., 2005) и в других странах (Feussner et al., 1996; Torres et al., 2014).

В исследованной выборке гетерозиготная форма заболевания в 73 % случаев была обусловлена редкими вариантами в гене *LDLR*. Определены два новых варианта NM_000527.5:c.266G>C, NP_000518.1:p.Cys89Ser и NM_000527.5:c.1123T>G, NP_000518.1:p.Tyr375Asp в гене *LDLR*. Два неродственных пробанда были носителями компаунд-гетерозиготных вариантов гена *LDLR*, при этом клиническое течение заболевания у пациентов соответствовало гомозиготной форме заболевания. В первом случае у пациентки 28 лет с диагнозом «определенная СГХС» были найдены редкие варианты NM_000527.5:c.796G>A, NP_000518.1:p.Asp266Asn и NM_000527.5:c.1054T>A, NP_000518.1:p.Cys352Ser в экзонах 5 и 7 гена *LDLR* (см. табл. 1). Во втором случае у пациентки 35 лет с диагнозом «определенная СГХС» компаунд-гетерозиготу составляли два миссенс-варианта в экзонах 3 и 8 гена *LDLR*. Одна замена локализована в экзоне 3 гена *LDLR* (NM_000527.5:c.266G>C, NP_000518.1:p.Cys89Ser), в котором ранее в этой позиции был описан редкий «вероятно патогенный» вариант rs875989894 NM_000527.5:c.266G>A, NP_000518.1:p.Cys89Tyr у пациентов с СГХС (Day et al., 1997; Graham et al., 1999; Fouchier et al., 2005).

Патогенность выявленного варианта также подтверждена анализом *in silico* (Mutation Taster score: 112, CADD score: 24.8 PolyPhen-2 score: 1.000). Другой новый миссенс-вариант локализован в экзоне 8 гена *LDLR*: NM_000527.5:c.1123T>G, NP_000518.1:p.Tyr375Asp (см. табл. 1). Этот миссенс-вариант приводит к замене аминокислоты в том же положении, в котором ранее были описаны другие миссенс-варианты, расцененные как вероятно патогенные у пациентов с СГХС (Assouline et al., 1997; García-García et al., 2001; Damgaard et al., 2005; Mollaki et al., 2014). Патогенность варианта также подтверждена анализом *in silico* (Mutation Taster score: 160, CADD score: 25.5, PolyPhen-2 score: 1.000). Оба обнаруженных варианта, NM_000527.5:c.266G>C, NP_000518.1:p.Cys89Ser и NM_000527.5:c.1123T>G, NP_000518.1:p.Tyr375Asp, не аннотированы в базе данных gnomAD (v2.1.1). По сово-

Таблица 1. Однонуклеотидные варианты в генах *LDLR*, *APOB*, *LPL* у пациентов с фенотипом СГХС

Номер варианта	Аминокислотная замена	Частота редкого аллеля, gnomAD (v2.1.1)	Интерпретация вариантов нуклеотидной последовательности согласно базам данных ClinVar, LOVD
<i>LDLR</i>			
rs121908038	p.Leu401His	НД	Вероятно патогенный
rs137853964	p.Val827Ile	A = 0.000919	
rs28942078	p.Val429Met	A = 0.000012	Патогенный
rs539080792	p.Glu337Lys	A = 0.000106	
rs570942190	p.Arg416Trp	T = 0.000024	
rs755757866	p.Cys340Tyr	T = 0.000008	Вероятно патогенный
rs761954844	p.Cys329Tyr	A = 0.000025	
rs879254566	p.Asp178Glu	НД	Патогенный
rs879254721	p.Glu308Lys	НД	
rs879254980	p.Glu558Ter	НД	
rs879255191	–	НД	Вероятно патогенный
rs875989907	p.Asp266Asn	A = 0.000012	Патогенный
rs879254769	p.Cys352Ser	НД	Вероятно патогенный
НД/rs875989894	p.Cys89Ser	НД	Новый вариант
НД	p.Tyr375Asp	НД	
<i>APOB</i>			
rs5742904	p.Arg3527Gln	T = 0.000294	Патогенный
<i>LPL</i>			
rs118204077	p.Arg270Cys	C = 0.000008	Патогенный

Примечание. НД – нет данных; номера белковых последовательностей, которые были использованы при аннотации вариантов: *LDLR* (NP_000518.1), *APOB* (NP_000375.3), *LPL* (NP_000228.1).

купности сведений они были расценены как вероятно патогенные варианты.

В образцах ДНК пациентов без функционально значимых замен в генах липидного метаболизма был выполнен MLPA анализ для определения структурных изменений (делеции, дубликации) в промоторе и экзонах гена *LDLR*. Данный анализ выявил делецию кодирующего участка гена *LDLR* в образцах ДНК двух неродственных пациентов NM_000527.4:c.(2140+1_2141-1)_(2311+1_2312-1)del.

При молекулярно-генетическом исследовании у трех пациентов из двух неродственных семей (пробанд и сын пробанда из одной семьи и пробанд из другой семьи) определен вариант rs5742904 (NM_000384.3:c.10580G>A, NP_000375.3:p.Arg3527Gln) (ClinVar Variation ID: 17890) в гене *APOB* (см. табл. 1).

Редкие замены участка гена *APOB*, кодирующего сайт связывания с рецептором ЛНП, ассоциированы с развитием гиперхолестеринемии. Один из вариантов данного участка, NP_000375.3:p.Arg3527Gln, приводит к развитию гиперхолестеринемии со сниженным клиренсом ЛНП вследствие дефекта структуры ЛНП, обеспечивающей связывание с рецептором ЛНП (Pullinger et al., 1995).

При анализе результатов таргетного высокопроизводительного секвенирования в гене *LPL* найден редкий патогенный вариант rs118204077 (NM_000237.3:c.808C>T, NP_000228.1:p.Arg270Cys) в гетерозиготной форме (ClinVar Variation ID: 1548) (см. табл. 1). Этот вариант

был идентифицирован у пациента 45 лет с гиперхолестеринемией (12.4 ммоль/л) и гипертриглицеридемией (17.4 ммоль/л), DLCN – 5 баллов. Ранее в данном локусе были описаны варианты, ассоциированные с развитием гипертриглицеридемии (Ma et al., 1994; Surendran et al., 2012), у пациентов с дефицитом липопротеинлипазы (Hegele et al., 2018; Teramoto et al., 2018).

По результатам выполненных молекулярно-генетических исследований, 52.5 % пациентов не были носителями патогенных вариантов в изученных генах липидного обмена. Из них с использованием алгоритма машинного обучения было выбрано пять человек с наиболее тяжелым течением СГХС для полногеномного секвенирования. У трех пациентов обнаружено четыре варианта в генах, ассоциированных с липидным метаболизмом, имеющих частоту редкого аллеля менее 0.01 %. Среди них два варианта были однонуклеотидными делециями: один затрагивал акцепторный сайт сплайсинга и один был миссенс-вариантом (табл. 2).

В гене *SIDT1*, кодирующем трансмембранный белок 1 семейства SID1, определен новый ранее не описанный вариант, который приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с кодона 809 (NM_017699.3:c.2426de, NP_060169.2:p.Leu809CysfsTer2). Ген состоит из 30 экзонов и находится в локусе 3q13.2 хромосомы 3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54847>). Согласно данным gnomAD, варианты с потерей функции описаны в этом

Таблица 2. Редкие варианты, определенные у пациентов с фенотипом СГХС в генах липидного обмена при полногеномном секвенировании

Ген	Положение (GRCh38/hg38)	Положение в кДНК (номер транскрипта)	Аминокислотная замена (номер белковой последовательности)	Генотип	Частота минорного аллеля	dbSNP ID
					gnomAD (v2.1.1)	RuSeq
<i>SIDT1</i>	chr3:113627646 GT>G	(NM_017699.3) c.2426del	(NP_060169.2) p.Leu809CysfsTer2	Гетерозигота	–	– Новый
<i>LRP1B</i>	chr2:140442605 G>C	(NM_018557.3) c.10313C>G	(NP_061027.2) p.Pro3438Arg	–	–	Новый
<i>PLD1</i>	chr3:171645024 G>A	(NM_002662.5) c.2430, –1G>A	–	–	0.00001768	0.0002457 rs760657350
<i>CETP</i>	chr16:56963054 GC>G	(NM_000078.3) c.165del	(NP_000069.2) p.Ser56AlafsTer11	–	0.00001415	0.0002081 rs753876598

гене, но ни один из них не был аннотирован как патогенный или вероятно патогенный, согласно данным ClinVar и литературы. Для этого гена показан pLI score = 0, что подтверждает устойчивость гена к вариантам с потерей функции. По совокупности данных мы расценили этот вариант как имеющий неопределенную клиническую значимость (критерий патогенности PM2).

Описан новый миссенс-вариант в гене *LRP1B* (LDL receptor related protein 1B) c.10313C>G p.Pro3438Arg в гетерозиготном состоянии. Ген локализован в локусе 2q22.1–q22.2 хромосомы 2, состоит из 92 экзонов и кодирует один из рецепторов семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53353>). Для этого варианта отсутствуют данные о частоте в gnomAD. Патогенность варианта также подтверждена анализом *in silico* (Mutation Taster score: 103, CADD score: 33, PolyPhen-2 score: 1.000). Большинство вариантов в этом гене являются доброкачественными (данные ClinVar, доступ: февраль 2023) либо вариантами с неопределенной клинической значимостью. По совокупности данных мы расценили этот вариант как вариант с неопределенной клинической значимостью (критерии патогенности PM2, PP3, BP1).

У одного из пациентов определен редкий гетерозиготный вариант в акцепторном сайте сплайсинга (NM_002662.5:c.2430, –1G>A) в гене фосфолипазы D1 (*PLD1*). Вариант зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD: 5 мутантных аллелей на 282 768 хромосом (гомозиготы не обнаружены). Ген *PLD1* кодирует фосфатидилхолин-специфическую фосфолипазу, которая катализирует гидролиз фосфатидилхолина с образованием фосфатидной кислоты и холина (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5337>). Этот ген расположен в локусе 3q26.31 и содержит 35 экзонов. Фосфолипаза D (PLD) и продукт ее ферментативной реакции, фосфатидная кислота (PA), регулируют клеточную адгезию иммунных клеток (макрофагов и нейтрофилов) к коллагену (Speranza et al., 2014).

Известно, что биаллельные варианты с потерей функции гена *PLD1* являются причиной врожденных пороков легочного и трехстворчатого клапанов, правого желудочка и выводного тракта правого желудочка сердца и неонатальной кардиомиопатии (Ta-Shma et al., 2017; Lahrouchi et al., 2021). По совокупности данных мы расценили эту

замену как носительство вероятно патогенного варианта в отношении врожденных пороков развития сердца (PM2, PVS1). В отношении СГХС мы отнесли обнаруженную замену к категории вариантов с неизвестной клинической значимостью (критерий патогенности PM2).

У одного из обследованных пациентов выявлена гетерозиготная однонуклеотидная делеция rs753876598, (NM_000078.3:c.165del) в гене *CETP* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1071>). Вариант аннотирован в базе данных ClinVar (ID1675625), зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD: 4 мутантных аллеля на 282 774 хромосом (гомозиготы не найдены). Известно, что варианты с потерей функции этого гена влияют на уровень ХС-ЛВП (Millwood et al., 2018; Li et al., 2021). По совокупности критериев оценки патогенности (PM2, PVS1) мы расценили этот вариант как вероятно патогенный. Ген *CETP* кодирует белок плазмы, который катализирует обмен триглицеридов и сложных эфиров холестерина между липопротеиновыми частицами (Oliveira, Raposo, 2020).

Обсуждение

Высокопроизводительное секвенирование используется не только для молекулярно-генетической диагностики СГХС, но и в качестве инструмента выявления вариантов, которые могут быть вовлечены в метаболизм липидов и их влияния на фенотип пациентов с СГХС (Miroshnikova et al., 2021). В настоящем исследовании идентифицированы 16 вариантов (15 однонуклеотидных замен и 1 делеция), которые ранее были классифицированы в базах ClinVar или LOVD как патогенные или вероятно патогенные, а также два новых миссенс-варианта в гене *LDLR*, расцененные как патогенные. При проведении полногеномного анализа мы обнаружили четыре дополнительных варианта в генах, ассоциированных с метаболизмом липидов, удовлетворяющих критериям поиска. Два из этих четырех вариантов ранее были описаны, два были новыми.

Один из генов, в которых были найдены редкие варианты у пациентов с СГХС, – *PLD1*, кодирует фермент фосфолипазы D1. Фосфолипаза D1 гидролизует мембранно-липидный фосфатидилхолин с образованием фосфатидной кислоты (Bowling et al., 2021). Фосфатидная кислота – промежуточный метаболит в синтезе всех мембранных глицерофосфолипидов, играет важную структурную роль

в живых клетках, способствуя биогенезу мембран (Tanguy et al., 2018). Кроме того, показана роль фосфатидной кислоты, а также фосфолипазы D1 в экзоцитозе (Tanguy et al., 2022).

Альтернативный сплайсинг мРНК *PLD1* приводит к появлению множества вариантов транскриптов, обладающих как каталитическими, так и регуляторными свойствами (Nelson, Frohman, 2015). Обнаружено, что рецессивные варианты в гене *PLD1* ассоциированы с тяжелыми правосторонними врожденными пороками сердца в двух семьях (Ta-Shma et al., 2017). У мышей, нокаут по *Pld1*, наблюдалось умеренное нарушение функции легочного и трехстворчатого клапана (Ta-Shma et al., 2017). Рецессивные варианты *PLD1* также ассоциированы с изолированными неонатальными кардиомиопатиями (Lahrouchi et al., 2021). Миссенс-варианты *PLD1* были сверхпредставлены у человека в областях белка, критических для каталитической активности, что приводило к значительному снижению ферментативной активности большинства мутантных белков (Lahrouchi et al., 2021). На клеточных линиях также показано, что повышенная экспрессия *PLD1* увеличивала образование липидных капель, тогда как нокаунт *PLD1* с помощью siRNA ингибировал этот процесс (Andersson et al., 2006).

Обнаруженный нами вариант (NM_002662.5:c.2430, -1G>A) у пробанда с СГХС без признаков врожденных пороков сердца находился в гетерозиготном состоянии. С учетом низкой частоты распространенности варианта и возможной его роли в субклеточном транспорте и образовании липидных капель данная замена интересна для последующего анализа у лиц с нарушениями липидного обмена.

Еще один редкий вариант найден в гене *LRP1B* (receptor related protein 1B, родственный рецептору белок 1). Белок *LRP1B* относится к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности (Strickland et al., 2002). Он играет роль в катаболизме липопротеинов, в связи с этим изучение редких вариантов гена *LRP1B* у лиц с СГХС является перспективным. Большинство из недавно идентифицированных лигандов *LRP1B* – хорошо известные факторы свертывания крови и метаболизма липопротеинов, что предполагает его возможное участие в атеросклеротическом процессе (Lee, 2019).

Белок *SIDT1* представляет собой многопроходный трансмембранный белок, принадлежащий к трансмембранному семейству *SID1*, с определенной гомологией последовательностей с *Caenorhabditis elegans* ChUP-1, холестерин-связывающим белком, расположенным во внутриклеточных везикулах (Valdes et al., 2012). Показана его экспрессия в эндолизосомах (Nguyen et al., 2019). Для гена *SIDT1* ранее было продемонстрировано участие в транспорте холестерина (Méndez-Acevedo et al., 2017), но в контексте изучения фенотипа семейной гиперхолестеринемии он не рассматривался. Найденный нами вариант, вероятнее всего, не участвует в формировании клинического фенотипа СГХС, так как оценка с помощью критериев ACMG позволяет отнести его к вариантам с неопределенной клинической значимостью, но для однозначной оценки его ассоциации с фенотипом СГХС требуются дополнительные данные.

Ген *CETP* кодирует белок CETP, переносящий эфиры холестерина. Данный белок регулирует концентрацию и размер частиц ЛПВП в крови и играет важную роль в обратном транспорте холестерина (Barter, Kastelein, 2006). Обнаружено, что повышенная активность *CETP* приводит к снижению уровня ЛПВП и связана с более высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний (Barter, 2011; Iwanicka et al., 2018). Варианты в гене *CETP* могут изменять липидный профиль крови (Wuni et al., 2022). В осуществленных нами ранее исследованиях одного из вариантов гена *CETP* была подтверждена его ассоциация с изменениями липидного профиля крови и риском развития инфаркта миокарда в популяции Западной Сибири (Semaev et al., 2019). При построении карты функциональных и физических ассоциаций предсказанным функциональным партнером для белка CETP был белок APOB, мутации в котором служат одной из причин развития семейной гиперхолестеринемии.

Для оценки патогенетических эффектов обнаруженных вариантов в формировании клинического фенотипа СГХС требуется проведение дополнительного сегрегационного и функционального анализов. Выявление новых патогенных вариантов позволит улучшить оценку риска развития СГХС и ее осложнений среди пациентов и членов их семей.

Заключение

Сочетание методов машинного обучения и полногеномного секвенирования у пробандов с клиническим диагнозом СГХС дало возможность выявить редкие варианты в генах *SIDT1*, *LRP1B*, *PLD1*, *CETP*, которые потенциально могут влиять на фенотип заболевания.

Список литературы / References

- Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., Воевода М.И., Сергиенко И.В., Шахтшнейдер Е.В., Покровский С.Н., Коновалов Г.А., Леонтьева И.В., Константинов В.О., Щербакова М.Ю., Захарова И.Н., Балахоннова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2019;15(1):58-98.
- [Ezhov M.V., Bazhan S.S., Ershova A.I., Meshkov A.N., Sokolov A.A., Kukharchuk V.V., Gurevich V.S., Voevoda M.I., Sergienko I.V., Shakhshneider E.V., Pokrovsky S.N., Kononov G.A., Leontyeva I.V., Konstantinov V.O., Shcherbakova M.Yu., Zakharova I.N., Balakhonova T.V., Filippov A.E., Akhmedzhanov N.M., Aleksandrova O.Yu., Lipovetsky B.M. Clinical guidelines for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis i Dislipidemii = The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias*. 2019;15(1):58-98. (in Russian)]
- Andersson L., Boström P., Ericson J., Rutberg M., Magnusson B., Marchesan D., Ruiz M., Asp L., Huang P., Frohman M.A., Borén J., Olofsson S.O. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J. Cell Sci*. 2006;119(Pt. 11):2246-2257. DOI 10.1242/jcs.02941.
- Assouline L., Leitersdorf E., Lambert M., Reshef A., Feoli-Fonseca J.C., Levy E. Identification of two novel LDL receptor gene defects in French-Canadian pediatric population: mutational analysis and biochemical studies. *Hum. Mutat*. 1997;9(6):555-562. DOI 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:6<555::AID-HUMU9>3.0.CO;2-0.
- Banda J.M., Sarraju A., Abbasi F., Parizo J., Pariani M., Ison H., Briskin E., Wand H., Dubois S., Jung K., Myers S.A., Rader D.J.,

- Leader J.B., Murray M.F., Myers K.D., Wilemon K., Shah N.H., Knowles J.W. Finding missed cases of familial hypercholesterolemia in health systems using machine learning. *NPJ Digit. Med.* 2019;2:23. DOI 10.1038/s41746-019-0101-5.
- Barter P.J., Kastelein J.J.P. Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006;47(3):492-499. DOI 10.1016/j.jacc.2005.09.042.
- Barter P.J. The causes and consequences of low levels of high density lipoproteins in patients with diabetes. *Diabetes Metab. J.* 2011; 35(2):101-106. DOI 10.4093/dmj.2011.35.2.101.
- Borén J., Chapman M.J., Krauss R.M., Packard C.J., Bentzon J.F., Binder C.J., Daemen M.J., Demer L.L., Hegele R.A., Nicholls S.J., Nordestgaard B.G., Watts G.F., Bruckert E., Fazio S., Ference B.A., Graham I., Horton J.D., Landmesser U., Laufs U., Masana L., Pasterkamp G., Raal F.J., Ray K.K., Schunkert H., Taskinen M.R., van de Sluis B., Wiklund O., Tokgozoglul., Catapano A.L., Ginsberg H.N. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* 2020;41(24):2313-2330. DOI 10.1093/eurheartj/ehz962.
- Bowling F.Z., Frohman M.A., Airola M.V. Structure and regulation of human phospholipase D. *Adv. Biol. Regul.* 2021;79:100783. DOI 10.1016/j.jbior.2020.100783.
- Damgaard D., Larsen M.L., Nissen P.H., Jensen J.M., Jensen H.K., Soerensen V.R., Jensen L.G., Faergeman O. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis.* 2005;180(1):155-160. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.001.
- Day I.N., Whittall R.A., O'Dell S.D., Haddad L., Bolla M.K., Gudnason V., Humphries S.E. Spectrum of LDL receptor gene mutations in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1997;10(2):116-127. DOI 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:2<116::AID-HUMU4>3.0.CO;2-I.
- Feussner G., Dobmeyer J., Nissen H., Hansen T.S. Unusual xanthomas in a young patient with heterozygous familial hypercholesterolemia and type III hyperlipoproteinemia. *Am. J. Med. Genet.* 1996; 65:149-154. DOI 10.1002/(SICI)1096-8628(19961016)65:2<149::AID-AJMG14>3.0.CO;2-Q.
- Fouchier S.W., Kastelein J.J., Defesche J.C. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Hum. Mutat.* 2005;26(6):550-556. DOI 10.1002/humu.20256.
- García-García A.B., Real J.T., Puig O., Cebolla E., Marín-García P., Martínez Ferrandis J.I., García-Sogo M., Civera M., Ascaso J.F., Carmena R., Armengod M.E., Chaves F.J. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Spain: Ten novel *LDLR* mutations and population analysis. *Hum. Mutat.* 2001;18(5):458-459. DOI 10.1002/humu.1218.
- Graham C.A., McClean E., Ward A.J., Beattie E.D., Martin S., O'Kane M., Young I.S., Nicholls D.P. Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1999;147(2):309-316. DOI 10.1016/s0021-9150(99)00201-4.
- Hegele R.A., Berberich A.J., Ban M.R., Wang J., Digenio A., Alexander V.J., D'Erasmus L., Arca M., Jones A., Bruckert E., Stroes E.S., Bergeron J., Civeira F., Witztum J.L., Gaudet D. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J. Clin. Lipidol.* 2018;12(4):920-927.e4. DOI 10.1016/j.jacl.2018.03.093.
- Iacocca M.A., Hegele R.A. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2017;17(7): 641-651. DOI 10.1080/14737159.2017.1332997.
- Iwanicka J., Iwanicki T., Niemiec P., Balcerzyk A., Krauze J., Górczyńska-Kosiorz S., Ochalska-Tyka A., Grzeszczak W., Żak I. Relationship between *CETP* gene polymorphisms with coronary artery disease in Polish population. *Mol. Biol. Rep.* 2018;45(6):1929-1935. DOI 10.1007/s11033-018-4342-1.
- Khera A.V., Won H.H., Peloso G.M., Lawson K.S., Bartz T.M., Deng X., van Leeuwen E.M., ... Correa A., Boerwinkle E., Merlino P.A., Ardisino D., Saleheen D., Gabriel S., Kathiresan S. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016;67(22):2578-2589. DOI 10.1016/j.jacc.2016.03.520.
- Lahrouchi N., Postma A.V., Salazar C.M., De Laughter D.M., Tjong F., Pihervá L., Bowling F.Z., ... Mulder B., Airola M.V., Kmoch S., Barnett J.V., Clur S.A., Frohman M.A., Bezzina C.R. Biallelic loss-of-function variants in *PLDI* cause congenital right-sided cardiac valve defects and neonatal cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 2021; 131(5):e142148. DOI 10.1172/JCI142148.
- Lee S. The genetic and epigenetic association of LDL Receptor Related Protein 1B (*LRP1B*) gene with childhood obesity. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):1815. DOI 10.1038/s41598-019-38538-2.
- Li W., Liu X., Huang C., Liu L., Tan X., Wang X. The loss-of-function mutation of *CETP* affects HDLc levels but not ApoA1 in patients with acute myocardial infarction. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2021;31(2):602-607. DOI 10.1016/j.numecd.2020.10.019.
- Ma Y., Liu M.S., Chitayat D., Bruin T., Beisiegel U., Benlian P., Foubert L., De Gennes J.L., Funke H., Forsythe I., Blaichman S., Papanikolaou M., Erkelens D.W., Kastelein J., Brunzell J.D., Hayden M.R. Recurrent missense mutations at the first and second base of codon Arg²⁴³ in human lipoprotein lipase in patients of different ancestries. *Hum. Mutat.* 1994;3(1):52-58. DOI 10.1002/humu.1380030109.
- Méndez-Acevedo K.M., Valdes V.J., Asanov A., Vaca L. A novel family of mammalian transmembrane proteins involved in cholesterol transport. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7450. DOI 10.1038/s41598-017-07077-z.
- Millwood I.Y., Bennett D.A., Holmes M.V., Boxall R., Guo Y., Bian Z., Yang L., Sansome S., Chen Y., Du H., Yu C., Hacker A., Reilly D.F., Tan Y., Hill M.R., Chen J., Peto R., Shen H., Collins R., Clarke R., Li L., Walters R.G., Chen Z., China Kadoorie Biobank Collaborative Group. Association of *CETP* gene variants with risk for vascular and nonvascular diseases among chinese adults. *JAMA Cardiol.* 2018;3(1):34-43. DOI 10.1001/jamacardio.2017.4177.
- Miroshnikova V.V., Romanova O.V., Ivanova O.N., Fedyakov M.A., Panteleeva A.A., Barbitoff Y.A., Muzalevskaya M.V., Urazgildeeva S.A., Gurevich V.S., Urazov S.P., Scherbak S.G., Sarana A.M., Semenova N.A., Anisimova I.V., Guseva D.M., Pchelina S.N., Glotov A.S., Zakharova E.Y., Glotov S.O. Identification of novel variants in the *LDLR* gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted sequencing. *Biomed. Rep.* 2021;14(1):15. DOI 10.3892/br.2020.1391.
- Mollaki V., Progiap P., Drogari E. Familial hypercholesterolemia in Greek children and their families: genotype-to-phenotype correlations and a reconsideration of *LDLR* mutation spectrum. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):798-804. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.031.
- Nelson R.K., Frohman M.A. Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J. Lipid. Res.* 2015;56(12):2229-2237. DOI 10.1194/jlr.R059220.
- Nguyen T.A., Smith B.R.C., Elgass K.D., Creed S.J., Cheung S., Tate M.D., Belz G.T., Wicks I.P., Masters S.L., Pang K.C. SIDT1 localizes to endolysosomes and mediates double-stranded RNA transport into the cytoplasm. *J. Immunol.* 2019;202(12):3483-3492. DOI 10.4049/jimmunol.1801369.
- Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Humphries S.E., Ginsberg H.N., Masana L., Descamps O.S., Wiklund O., ... Kuivenhoven J.A., Pajukanta P., Ray K., Stalenhoef A.F., Stroes E., Taskinen M.R., Tybjaerg-Hansen A., European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* 2013;34(45):3478-3490. DOI 10.1093/eurheartj/ehz273.
- Oliveira H.C.F., Raposo H.F. Cholesteryl ester transfer protein and lipid metabolism and cardiovascular diseases. In: Jiang X.-C. (Ed).

- Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 1276. Singapore: Springer, 2020;15-25. DOI 10.1007/978-981-15-6082-8_2.
- Pullinger C.R., Hennessy L.K., Chatterton J.E., Liu W., Love J.A., Mendel C.M., Frost P.H., Malloy M.J., Schumaker V.N., Kane J.P. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J. Clin. Invest.* 1995;95(3):1225-1234. DOI 10.1172/JCI117772.
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L., ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015;17(5):405-424. DOI 10.1038/gim.2015.30.
- Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006;2006(1):pdb.prot4455. DOI 10.1101/pdb.prot4455.
- Santos R.D., Gidding S.S., Hegele R.A., Cuchel M.A., Barter P.J., Watts G.F., Baum S.J., Catapano A.L., Chapman M.J., Defesche J.C., Folco E., Freiburger T., Genest J., Hovingh G.K., Harada-Shiba M., Humphries S.E., Jackson A.S., Mata P., Moriarty P.M., Raal F.J., Al-Rasadi K., Ray K.K., Reiner Z., Sijbrands E.J., Yamashita S., International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(10):850-861. DOI 10.1016/S2213-8587(16)30041-9.
- Semaev S., Shakhtshneider E., Orlov P., Ivanoshchuk D., Malyutina S., Gafarov V., Ragino Y., Voevoda M. Association of rs708272 (*CETP* gene variant) with lipid profile parameters and the risk of myocardial infarction in the white population of Western Siberia. *Biomolecules.* 2019;9(11):739. DOI 10.3390/biom9110739.
- Speranza F., Mahankali M., Henkels K.M., Gomez-Cambronero J. The molecular basis of leukocyte adhesion involving phosphatidic acid and phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 2014;289(42):28885-28897. DOI 10.1074/jbc.M114.597146.
- Strickland D.K., Gonias S.L., Argraves W.S. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13(2):66-74. DOI 10.1016/S1043-2760(01)00526-4.
- Surendran R.P., Visser M.E., Heemelaar S., Wang J., Peter J., Defesche J.C., Kuivenhoven J.A., Hosseini M., Péterfy M., Kastelein J.J., Johansen C.T., Hegele R.A., Stroes E.S., Dallinga-Thie G.M. Mutations in *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIIIBP1* and *LMF1* in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J. Intern. Med.* 2012;272(2):185-196. DOI 10.1111/j.1365-2796.2012.02516.x.
- Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., Mering C.V. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607-D613. DOI 10.1093/nar/gky1131.
- Tanguy E., Kassas N., Vitale N. Protein-phospholipid interaction motifs: A focus on phosphatidic acid. *Biomolecules.* 2018;8(2):20. DOI 10.3390/biom8020020.
- Tanguy E., Wolf A., Wang Q., Chasserot-Golaz S., Ory S., Gasman S., Vitale N. Phospholipase D1-generated phosphatidic acid modulates secretory granule trafficking from biogenesis to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *Adv. Biol. Regul.* 2022;83:100844. DOI 10.1016/j.jbior.2021.100844.
- Ta-Shma A., Zhang K., Salimova E., Zerneck A., Sieiro-Mosti D., Stegner D., Furtado M., Shaag A., Perles Z., Nieswandt B., Rein A.J., Rosenthal N., Neiman A.M., Elpeleg O. Congenital valvular defects associated with deleterious mutations in the *PLD1* gene. *J. Med. Genet.* 2017;54(4):278-286. DOI 10.1136/jmedgenet-2016-104259.
- Teramoto R., Tada H., Kawashiri M.A., Nohara A., Nakahashi T., Konno T., Inazu A., Mabuchi H., Yamagishi M., Hayashi K. Molecular and functional characterization of familial chylomicronemia syndrome. *Atherosclerosis.* 2018;269:272-278. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.006.
- Torres M.M.T., Mora-Hernández S., Vázquez Cárdenas N.A., González Jaimes A. Homozygous familial hypercholesterolemia: the c.1055G>A mutation in the *LDLR* gene and clinical heterogeneity. *J. Clin. Lipidol.* 2014;8(5):525-527. DOI 10.1016/j.jacl.2014.05.002.
- Vaezi Z., Amini A. Familial Hypercholesterolemia. In: StatPearls. StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556009/> (accessed on 24 July 2022).
- Valdes V.J., Athie A., Salinas L.S., Navarro R.E., Vaca L. CUP-1 is a novel protein involved in dietary cholesterol uptake in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2012;7(3):e33962. DOI 10.1371/journal.pone.0033962.
- Vasilyev V., Zakharova F., Bogoslovskaya T., Mandelshtam M. Familial hypercholesterolemia in Russia: three decades of genetic studies. *Front. Genet.* 2020;11:550591. DOI 10.3389/fgene.2020.550591.
- Wiegman A., Gidding S.S., Watts G.F., Chapman M.J., Ginsberg H.N., Cuchel M., Ose L., ... Santos R.D., Stalenhoef A.F., Steinhagen-Thiessen E., Stroes E.S., Taskinen M.R., Tybjærg-Hansen A., Wiklund O., European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur. Heart J.* 2015;36(36):2425-2437. DOI 10.1093/eurheartj/ehv157.
- World Health Organization-Human genetics DoNDP. Familial hypercholesterolaemia: report of a second World Health Organization consultation, Geneva: WHO; 1999. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66346> (Application: 14.11.2022).
- Wuni R., Kuhnle G.G.C., Wynn-Jones A.A., Vimalaswaran K.S. A nutrigenetic update on *CETP* gene-diet interactions on lipid-related outcomes. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2022;24(2):119-132. DOI 10.1007/s11883-022-00987-y.
- Zakharova F.M., Damgaard D., Mandelshtam M.Y., Golubkov V.I., Nissen P.H., Nilsen G.G., Stenderup A., Lipovetsky B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Vasilyev V.B., Faergeman O. Familial hypercholesterolemia in St.-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med. Genet.* 2005;6:6. DOI 10.1186/1471-2350-6-6.

ORCID ID

D.E. Ivanoshchuk orcid.org/0000-0002-0403-545X
A.B. Kolker orcid.org/0000-0002-7048-6419
O.V. Timoshchenko orcid.org/0000-0002-6584-2060
S.E. Semaev orcid.org/0000-0003-3999-8501
E.V. Shakhtshneider orcid.org/0000-0001-6108-1025

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-25-00743.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.12.2022. После доработки 02.05.2023. Принята к публикации 03.05.2023.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Метаболомный профиль сыворотки крови при экспериментальной артериальной гипертензии

А.А. Серяпина¹✉, А.А. Малявко¹, Ю.К. Политыко¹, Л.В. Яньшолё², Ю.П. Центалович², А.Л. Маркель^{1,3}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ seryapina@bionet.nsc.ru

Аннотация. Этиология гипертонической болезни неочевидна, поскольку одновременно оказываются задействованы различные системы организма, тем или иным образом связанные с регуляцией артериального давления: симпатическая нервная, ренин-ангиотензин-альдостероновая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая системы, почечные и эндотелиальные механизмы. На патогенез гипертонической болезни влияет множество как генетических, так и средовых факторов, что обуславливает популяционную гетерогенность заболевания у людей. В связи с этим возникает необходимость в проведении исследований на экспериментальных моделях – инбредных линиях животных. Таковой является линия крыс НИСАГ (ISIAH), воспроизводящая наследственную индуцированную стрессом артериальную гипертензию, максимально приближенную к артериальной гипертензии у людей. Для определения специфических маркеров заболеваний используются «омиксные» технологии, в том числе метаболомные, которые дают представление о профиле концентраций низкомолекулярных соединений – аминокислот, липидов, углеводов, фрагментов нуклеиновых кислот – в биологических образцах, доступных для клинического анализа (кровь и моча). В настоящей работе проведен анализ метаболомного профиля сыворотки крови самцов крыс линии НИСАГ с генетической стресс-зависимой формой артериальной гипертензии по сравнению с нормотензивной линией крыс WAG. С применением метода спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) в образцах сыворотки крови было идентифицировано 56 метаболитов, при этом для 18 метаболитов выявлены достоверные различия по концентрации в сыворотке крови между линиями крыс. Статистический анализ полученных данных показал, что гипертензивный статус крыс НИСАГ характеризуется сочетанным повышением концентраций лейцина, изолейцина, валина, мио-инозитола, изобутирата, глутамата, глутамина, орнитина и креатинфосфата и снижением концентраций 2-гидроксиизобутирата, бетаина, тирозина и триптофана. Такие изменения концентраций метаболитов ассоциированы с характерными для гипертензивного статуса изменениями в регуляции метаболизма глюкозы (метаболомные маркеры – лейцин, изолейцин, валин и мио-инозитол), синтеза оксида азота (орнитин) и катехоламинов (тирозин) и с воспалительными процессами (метаболомные маркеры – бетаин, триптофан). Таким образом, идентификация метаболомного профиля стресс-зависимой формы артериальной гипертензии представляется важным результатом, полезным для разработки персонализированного подхода к профилактике и лечению гипертонической болезни. Ключевые слова: артериальная гипертензия; крысы НИСАГ (ISIAH); метаболомные маркеры.

Для цитирования: Серяпина А.А., Малявко А.А., Политыко Ю.К., Яньшолё Л.В., Центалович Ю.П., Маркель А.Л. Метаболомный профиль сыворотки крови при экспериментальной артериальной гипертензии. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):530-538. DOI 10.18699/VJGB-23-64

Metabolic profile of blood serum in experimental arterial hypertension

A.A. Seryapina¹✉, A.A. Malyavko¹, Yu.K. Polityko¹, L.V. Yanshole², Yu.P. Tsentalovich², A.L. Markel^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² International Tomography Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ seryapina@bionet.nsc.ru

Abstract. The etiology of essential hypertension is intricate, since it employs simultaneously various body systems related to the regulation of blood pressure in one way or another: the sympathetic nervous system, renin-angiotensin-aldosterone and hypothalamic-pituitary-adrenal systems, renal and endothelial mechanisms. The pathogenesis of hypertension is influenced by a variety of both genetic and environmental factors, which determines the heterogeneity of the disease in human population. Hence, there is a need to perform research on experimental models – inbred animal strains, one of them being ISIAH rat strain, which is designed to simulate inherited stress-induced arterial hypertension as close as possible to primary (or essential) hypertension in humans. To determine specific markers of diseases, various omics technologies are applied, including metabolomics, which makes it possible to evaluate the content of low-mole-

cular compounds – amino acids, lipids, carbohydrates, nucleic acids fragments – in biological samples available for clinical analysis (blood and urine). We analyzed the metabolic profile of the blood serum of male ISIAH rats with a genetic stress-dependent form of arterial hypertension in comparison with the normotensive WAG rats. Using the method of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectroscopy), 56 metabolites in blood serum samples were identified, 18 of which were shown to have significant interstrain differences in serum concentrations. Statistical analysis of the data obtained showed that the hypertensive status of ISIAH rats is characterized by increased concentrations of leucine, isoleucine, valine, myo-inositol, isobutyrate, glutamate, glutamine, ornithine and creatine phosphate, and reduced concentrations of 2-hydroxyisobutyrate, betaine, tyrosine and tryptophan. Such a ratio of the metabolite concentrations is associated with changes in the regulation of glucose metabolism (metabolic markers – leucine, isoleucine, valine, myo-inositol), of nitric oxide synthesis (ornithine) and catecholamine pathway (tyrosine), and with inflammatory processes (metabolic markers – betaine, tryptophan), all of these changes being typical for hypertensive status. Thus, metabolic profiling of the stress-dependent form of arterial hypertension seems to be an important result for a personalized approach to the prevention and treatment of hypertensive disease.

Key words: arterial hypertension; ISIAH rats; metabolic markers.

For citation: Seryapina A.A., Malyavko A.A., Polityko Yu.K., Yanshole L.V., Tsentalovich Yu.P., Markel A.L. Metabolic profile of blood serum in experimental arterial hypertension. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):530-538. DOI 10.18699/VJGB-23-64

Введение

Гипертоническая болезнь – это комплексное мультифакторное заболевание, определяемое как генетическими факторами, так и средой, а также эффектами взаимодействия генотип–среда. В настоящее время в распоряжении клинической медицины имеется обширный список антигипертензивных препаратов, которые также можно комбинировать (Laurent, 2017). Однако фактически используется лишь небольшая часть из них: вазодилаторы, диуретики, блокаторы некоторых рецепторов и ионных каналов. Они воздействуют на конечные звенья патогенеза артериальной гипертензии и обычно не адресуются к исходным причинным механизмам заболевания. Этим отчасти можно объяснить то, что успешно достичь целевых значений артериального давления (АД) и контролировать их удается в среднем только у 30 % больных гипертонической болезнью (Thoenes et al., 2010).

Для повышения эффективности терапии необходимы объективные критерии, позволяющие с уверенностью устанавливать индивидуальные особенности этиологии и патогенеза заболевания. В первую очередь рассматриваются генетические маркеры. Гены, ассоциированные с артериальной гипертензией, выявлены в многочисленных исследованиях, включая полногеномный анализ огромного числа полиморфизмов. Однако эти полиморфные локусы берут на себя лишь небольшой процент (2–3 %) изменчивости по уровню АД в тестируемых популяциях (Hoffmann et al., 2017). Очевидно, превалирует вклад средовых факторов, а также эффектов взаимодействия генотипа со средой. Большое значение могут иметь также неаддитивные межгенные взаимодействия и эпигенетические влияния (Toland et al., 2008; Niu et al., 2009; Friso et al., 2015).

В последние десятилетия одновременно с анализом генома и транскриптома развиваются метаболомные и протеомные исследования. Метаболомный профиль биологических тканей отражает результат влияния на метаболизм как генов, так и среды, что дает возможность получить интегральную оценку многофакторных влияний. Поэтому поиск метаболомных маркеров наряду с генетическими позволяет более полно описать картину патогенетических процессов, происходящих у конкретного

человека, а также проводить кластеризацию пациентов по разным формам гипертензивных состояний. Знание о метаболических путях, лежащих в основе того или иного типа артериальной гипертензии, даст возможность более рационально проводить ее терапию (Byrd, 2016).

Число комплексных метаболомных исследований патогенеза артериальной гипертензии пока невелико. Однако у пациентов с гипертонической болезнью обнаружены специфические изменения липидного профиля сыворотки крови (Brindle et al., 2003), изменение углеводного обмена – повышение уровней глюкозы и галактозы и снижение концентрации фруктозы (Liu Y. et al., 2011), повышение концентрации альфа-1-кислого гликопротеина – маркера воспалительных процессов (De Meyer et al., 2008). Получены некоторые данные о метаболомном профиле линии крыс со спонтанной гипертонией (SHR): снижение с возрастом концентраций некоторых аминокислот (серин, метионин, орнитин, фенилаланин) и повышение содержания свободных жирных кислот в плазме крови (Aa et al., 2010), сниженные, по сравнению с нормотензивным контролем, уровни цитрата и альфа-кетоглутарата в моче в возрасте 8 недель (Akira et al., 2008), увеличение содержания таурина и креатина в моче в возрасте 12 и 26 недель (Akira et al., 2005).

В настоящем исследовании мы впервые провели анализ метаболомного профиля сыворотки крови у экспериментальных животных с наследственной стресс-чувствительной артериальной гипертензией, каковыми являются крысы линии НИСАГ.

Материалы и методы

Экспериментальные животные – самцы крыс линии НИСАГ (Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension, ISIAH) с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией ($n = 10$), контрольные нормотензивные самцы крыс линии WAG (Wistar Albino Glaxo) ($n = 10$), все в возрасте 3–4 месяцев. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН, получали полнорационный корм («Чара», Россия) и питьевую воду *ad libitum*. Все процедуры с животными соответствовали этическим стандартам, утверж-

денным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Межинститутской комиссии по биологической этике при Институте цитологии и генетики СО РАН (протокол № 127 от 08.09.2022).

Мониторинг АД проводили с использованием прибора для неинвазивного измерения АД (ВІОРАС, США) методом tail-cuff (при помощи специальной хвостовой манжеты) с предварительной адаптацией животных к данной процедуре в течение 3–4 дней.

Образцы сыворотки крови получали при эвтаназии экспериментальных животных методом декапитации. Собранную периферическую кровь отстаивали в течение 1 часа для формирования первичного сгустка, затем центрифугировали (+4 °С, 3000 об/мин, 20 мин), полученную сыворотку крови хранили при –70 °С.

Экстракцию метаболитов из образцов сыворотки крови осуществляли в ЦКП «Масс-спектрометрические исследования» Международного томографического центра СО РАН, в лаборатории протеомики и метаболомики. Экстракцию метаболитов производили с использованием смеси метанол-хлороформ-вода в соотношении 1:1:1, согласно ранее разработанному протоколу (Zelentsova et al., 2020; Fomenko et al., 2022). Объем сыворотки для исследования составлял 300 мкл. Лиофилизированные экстракты разводили в 600 мкл дейтерированного фосфатного буфера (50 мМ, рН 7.2) с добавлением внутреннего стандарта DSS (2×10^{-5} М 3-(триметилсилил)пропан-1-сульфонат натрия).

Спектры ЯМР получены на ЯМР-спектрометре Avance III HD 700 MHz (Bruker BioSpin, Германия), оборудованном криомагнитом Ascend с полем 16.44 Тесла. Параметры съемки описаны в более ранних работах (Zelentsova et al., 2020; Fomenko et al., 2022). Для обработки спектров и интегрирования сигналов применяли программу MestReNova v12.0.

Идентификацию метаболитов в исследуемых образцах проводили с помощью базы данных Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca/>) и собственных данных о метаболомном составе биологических жидкостей человека и животных (Tsentlovich et al., 2020; Fomenko et al., 2022).

Статистическую обработку метаболомных данных выполняли с использованием пакета программ Statistica 8 (<http://statsoft.ru/>) и на веб-платформе MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (Pang et al., 2021), с применением многомерного анализа (метод главных компонент) и непараметрического метода оценки межгрупповых различий (U-критерий Манна–Уитни). Значения при $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Анализ ЯМР-спектров позволил определить концентрации 56 метаболитов в сыворотке крови крыс НИСАГ (АД = 205.6 ± 7.3 мм рт. ст.) и WAG (АД = 136.6 ± 3.1 мм рт. ст.). Для 18 из них было показано наличие достоверных межлинейных различий по концентрации в сыворотке крови (см. таблицу).

Концентрации метаболитов сыворотки крови крыс НИСАГ и WAG

Метаболиты (нмоль/мл)	WAG					НИСАГ				
	Среднее значение	Медианное значение	Стандартное отклонение	Первый квартиль	Третий квартиль	Среднее значение	Медианное значение	Стандартное отклонение	Первый квартиль	Третий квартиль
Лейцин	106.29**	104.72	9.65	99.89	108.94	138.70	135.55	26.61	129.40	156.83
Изолейцин	58.66**	58.64	5.82	52.98	59.57	93.26	95.46	25.46	75.59	114.66
Валин	142.48**	139.02	13.54	134.73	145.72	207.97	210.07	44.06	177.35	238.86
Изобутират	6.59**	6.34	1.02	5.67	7.13	8.55	8.89	1.61	7.75	9.76
2-гидроксиизобутират	28.87*	28.61	3.18	25.85	31.46	16.29	16.28	3.30	13.85	17.63
Глутамат	159.25***	159.60	12.76	150.60	166.95	208.58	197.27	22.40	194.68	222.23
Глутамин	687.06**	694.13	54.04	664.59	711.75	894.53	968.68	147.72	773.79	1007.59
Аспарагин	55.78*	51.00	12.07	47.29	67.57	72.87	76.02	13.92	59.06	78.80
2'-дезоксигуанидин	70.53***	73.91	7.65	65.59	76.82	49.77	50.29	8.99	43.98	54.92
Креатинфосфат	7.99**	8.24	2.70	6.92	10.30	21.11	22.68	9.75	16.72	27.83
Орнитин	47.34***	48.02	4.22	44.13	49.70	86.21	89.47	14.19	80.54	93.64
Бетаин	139.64**	138.45	23.52	123.96	160.52	98.62	88.76	29.18	83.20	97.21
Мио-инозитол	89.79***	88.96	8.78	83.53	98.59	132.74	127.83	25.71	114.09	143.01
Триптофан	110.88***	110.77	11.31	101.11	119.81	85.64	86.93	6.27	80.82	91.54
Тирозин	92.50**	92.87	8.39	84.27	98.39	78.42	77.15	10.17	71.00	85.05
Гистидин	66.68**	66.43	5.90	61.44	71.38	76.00	77.21	6.72	70.80	80.52
1-метилгистидин	9.71**	10.67	1.88	8.11	11.04	19.05	16.59	10.09	12.00	21.19
Метионин сульфоксид	36.88***	37.56	3.63	33.76	39.72	45.16	45.56	2.18	43.40	46.45

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

У крыс НИСАГ концентрации лейцина, изолейцина, валина, изобутирата, глутамата, глутамина, аспарагина, креатинфосфата, орнитина, мио-инозитола, гистидина, 1-метилгистидина, метионинсульфоксида в сыворотке крови были достоверно выше, чем у крыс WAG, а концентрации 2-гидроксиизобутирата, 2'-дезоксигуанидина, бетаина, триптофана и тирозина у крыс НИСАГ были снижены по сравнению с нормотензивным контролем.

Для того чтобы выделить метаболиты, связанные с наличием повышенного АД у крыс линии НИСАГ, был проведен многомерный анализ. С помощью метода главных компонент выявлено два основных фактора (две оси), отвечающих в совокупности за 47.2 % общей вариации концентраций исследуемых метаболитов в сыворотке крови.

Как видно из рис. 1, экспериментальные животные кластеризованы по признаку принадлежности к гипертензивной или нормотензивной линии в пространстве двух главных компонент. Проекция этих кластеров на ось первой компоненты практически не перекрываются, в то время как проекция их на ось второй главной компоненты совпадают. Таким образом, первую главную компоненту можно охарактеризовать как ось наличия/отсутствия гипертензивного статуса. Для установления связи концентраций определяемых метаболитов с гипертензивным статусом необходимо рассмотреть их распределение по отношению к первой главной компоненте. Об этом можно судить по «нагрузкам», которые делают метаболиты на первую главную компоненту.

Положительные нагрузки на ось первой компоненты дали 2-гидроксиизобутират, триптофан, тирозин, бетаин, 2'-дезоксигуанидин; отрицательные нагрузки имели орнитин, валин, изолейцин, лейцин, изобутират, глутамат, глутамин, аспарагин, креатинфосфат, мио-инозитол, гистидин, 1-метилгистидин, метионин сульфоксид (рис. 2). Таким образом, перечисленные метаболиты в значительной степени ответственны за кластеризацию групп экспериментальных животных по уровню их АД.

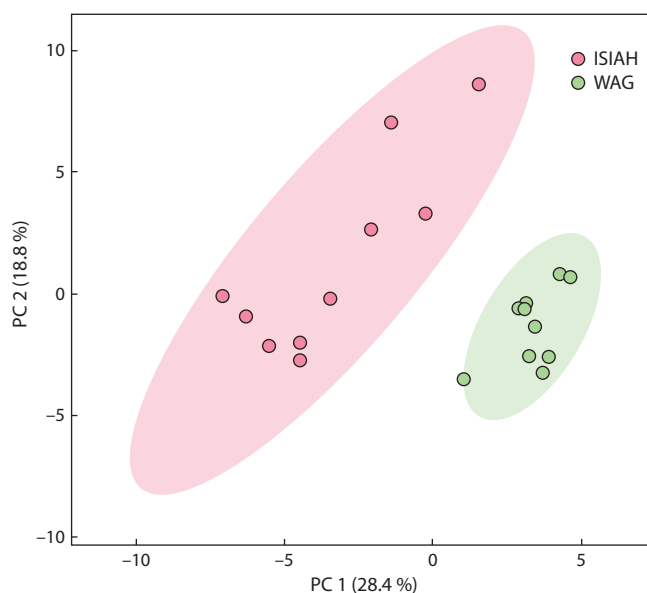


Рис. 1. Расположение гипертензивных крыс линии НИСАГ и нормотензивных крыс линии WAG в координатах главных компонент (PC 1 и PC 2), полученных при анализе метаболомного профиля сыворотки крови с использованием веб-платформы MetaboAnalyst 5.0.

Обсуждение

Протеиногенные аминокислоты с разветвленным строением алифатической боковой цепи (BCAA, branched-chain amino acids)

Аминокислоты группы BCAA – лейцин, изолейцин и валин – незаменимые, они участвуют в процессах синтеза и деградации белков, а также являются сигнальными молекулами в метаболизме глюкозы, активируя комплекс mTORC1, который фосфорилирует субстрат инсулинового рецептора IRS-1 (Yoshizawa, 2012; Yoon, 2016). Повышенные концентрации аминокислот группы BCAA в плазме крови, согласно ряду исследований, ассоциированы с

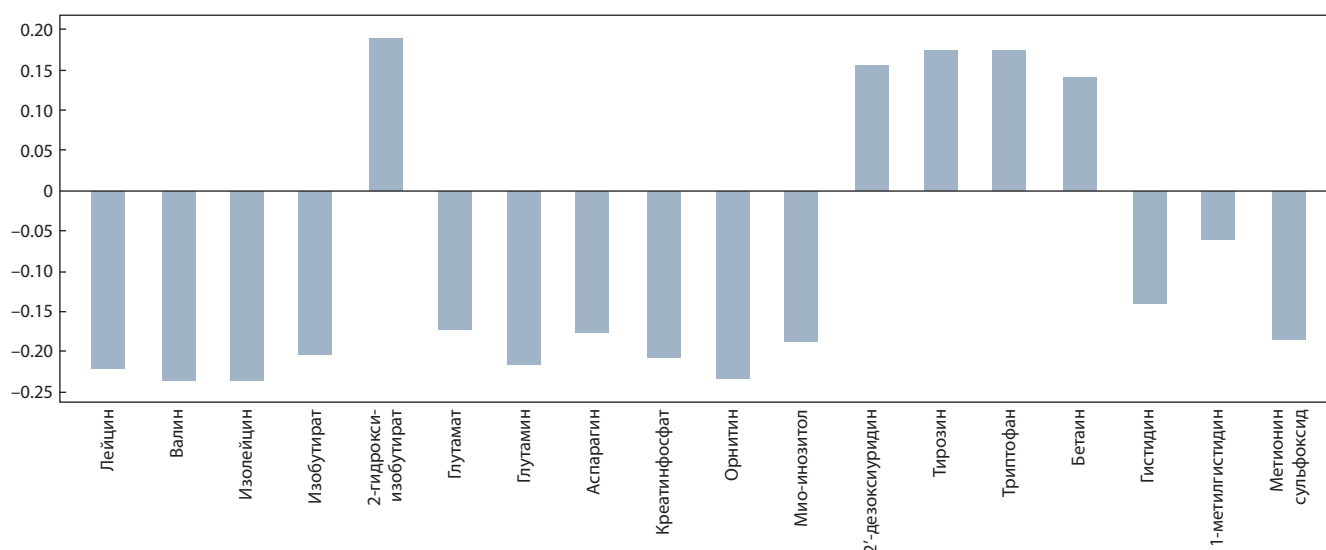


Рис. 2. Нагрузки на первую главную компоненту метаболитов, концентрации которых в сыворотке крови достоверно различались у крыс линий НИСАГ и WAG.

ожирением, инсулинорезистентностью, снижением толерантности к глюкозе и диабетом 2-го типа (Newgard et al., 2009; Wang et al., 2011; Roberts et al., 2014). Показано, что лейцин, изолейцин и валин участвуют в гипоталамической регуляции метаболизма глюкозы в печени (Arrieta-Cruz et al., 2016).

Перспективные когортные исследования с участием большого числа пациентов (2243 (Hu et al., 2016) и 27041 (Tobias et al., 2018)) свидетельствуют, что повышенные концентрации аминокислот группы ВСАА в плазме крови положительно коррелируют с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (инсульт, инфаркт миокарда, коронарная болезнь). У крыс линии НИСАГ ранее уже было обнаружено снижение уровня иммунореактивного инсулина в крови и толерантности к глюкозе, вероятно, вследствие генетически обусловленной повышенной активности симпатoadренальной и тиреоидной систем (Shorin et al., 1990; Vuzueva et al., 2006). Активация симпатической иннервации поджелудочной железы снижает продукцию инсулина β -клетками, действуя через α_2 -адренорецепторы (van Duk et al., 1995), а тиреоидные гормоны оказывают влияние на продукцию инсулина через регуляцию секреции инсулиноподобного фактора роста 1 (Cavaliere et al., 1987). Эти данные согласуются с результатами настоящего исследования: концентрации лейцина, изолейцина и валина в сыворотке крови достоверно повышены у крыс НИСАГ по сравнению с контролем (см. таблицу), что дает основание предположить, что аминокислоты группы ВСАА могут рассматриваться в качестве метаболических маркеров наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензии.

Мио-инозитол

Некоторые изомеры инозитола, в частности мио-инозитол, обладают инсулиноподобными свойствами и могут снижать инсулинорезистентность у пациентов с метаболическим синдромом (Giordano et al., 2011; Croze, Soulaige, 2013). Показано, что концентрация мио-инозитола в плазме крови ассоциирована с уровнем АД у пациентов с гипертензией (Yang et al., 2016), а применение мио-инозитола в составе пищевой добавки в течение полугода снизило концентрации биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в менопаузе и с метаболическим синдромом в анамнезе (D'Anna et al., 2014). Предполагается, что производные инозитола воздействуют на P_3 -рецептор, который регулирует сократимость гладкомышечных стенок сосудов через кальциевые каналы L-типа (Abou-Saleh et al., 2013). Повышенный уровень мио-инозитола в сыворотке крови крыс линии НИСАГ с наследственной стресс-индуцированной гипертензией может свидетельствовать о его участии в патогенезе гипертензивного статуса крыс данной линии.

Короткоцепочечные жирные кислоты (short-chain fatty acids, SCFA)

Короткоцепочечные жирные кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, изомасляная, валериановая, изовалериановая и др.) образуются в толстом кишечнике при ферментации клетчатки, являются важным источником энергии для колоноцитов, а также имеют противо-

воспалительные и противоопухолевые свойства (Andoh et al., 2003; Fernández et al., 2016). Кислоты группы SCFA, вступая в реакции ацилирования, могут модифицировать гистоны, таким образом регулируя экспрессию генов, вовлеченных в механизмы развития метаболического синдрома, диабета 2-го типа, ишемического поражения тканей (Sabari et al., 2017; Chen et al., 2020). Снижение образования короткоцепочечных жирных кислот, продуцируемых бактериями кишечника, приводит к его дисфункции, воспалению, почечной недостаточности и, как следствие, повышению артериального давления (Kim et al., 2018; Felizardo et al., 2019). У крыс линии SHR со спонтанной гипертензией повышенное АД было ассоциировано с пониженным содержанием в микробиоте кишечника бактерий, продуцирующих ацетат и бутират (Yang et al., 2015).

Исследована также взаимосвязь между уровнем АД и содержанием различных кислот группы SCFA у солеустойчивых крыс Dahl: высокая солевая нагрузка привела к повышению концентрации ацетата, пропионата и изобутирата в образцах фекалий (Bier et al., 2018). Механизмы такой взаимосвязи пока подробно не изучены, но существуют свидетельства того, что короткоцепочечные жирные кислоты могут воздействовать на сосуды и почки через эндотелиальные рецепторы, связанные с G-белками, что приводит к изменению уровня АД (Natarajan et al., 2016). У гипертензивных крыс НИСАГ также наблюдается изменение баланса кислот SCFA и их производных при сравнении с нормотензивным контролем: достоверно повышено содержание в крови изобутирата и понижено содержание 2-гидроксиизобутирата (см. таблицу).

Глутамат, глутамин

Показаны ассоциации концентраций глутамата и глутамина, а также активности печеночной аспаргат-аминотрансферазы с инсулинорезистентностью и развитием метаболического синдрома (Sookoian, Pirola, 2012). Существуют свидетельства того, что содержание глутамата в плазме крови положительно коррелирует с уровнем АД, индексом массы тела, концентрацией инсулина и триглицеридов. Соотношение глутамин/глутамат имеет обратную связь с этими параметрами (Liu X. et al., 2019). Учитывая, что у крыс НИСАГ в данном исследовании повышены уровни как глутамата, так и глутамина по отношению к контрольным крысам WAG, но при этом содержание глутамина (894.53 нмоль/мл) в несколько раз превышает содержание глутамата (208.58 нмоль/мл), определение причины межлинейных различий в концентрациях глутамата и глутамина требует дополнительных исследований.

Глутамат и глутамин также участвуют в метаболизме аргинина и орнитина, которые задействованы в цикле образования мочевины и оксида азота (Wilson et al., 2001). Концентрация орнитина в плазме крыс НИСАГ повышена по отношению к контролю. Известно, что введение α -дифлюорометилорнитина привело к восстановлению эндотелиальной функции и предотвратило повышение АД у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR (Demougeot et al., 2005). В более раннем исследовании на этой же линии крыс α -дифлюорометилорнитин снизил интенсивность сокращения аорты и хвостовой артерии в ответ на электрическую стимуляцию и введение норадреналина,

при этом также наблюдались уменьшение толщины стенки артерий и снижение содержания полиаминов в сосудах (Soltis et al., 1994).

Метаболиты, связанные с воспалительными процессами

В исследовании с участием здоровых добровольцев (323 человека) и пациентов, перенесших ишемический инсульт (323 человека), обнаружено, что холин, как и его метаболит – бетаин, способствует снижению риска возникновения сердечно-сосудистых осложнений (Zhong et al., 2021). Показано также, что длительное применение холина и бетаина в качестве пищевой добавки снижало уровень АД у больных гипертензией (Golzarand et al., 2021). Внутривенное введение бетаина крысам, у которых была смоделирована легочная гипертензия, привело к снижению АД в правом желудочке и легочной артерии, уменьшению степени гипертрофии желудочка и ремоделированию стенки артерии, предположительно, за счет противовоспалительного действия; также бетаин снизил уровни MCP-1, ET-1, NF-κB, TNF-α, IL-1β (Yang et al., 2018).

Триптофан – незаменимая ароматическая аминокислота. В организме млекопитающих метаболизм триптофана осуществляется по трем частично пересекающимся направлениям. Основной путь – кинурениновый – окисление и разрушение индольного кольца с образованием производных: кинуреновой и антралиновой кислот. Одна из 60 молекул триптофана при этом превращается в никотиновую кислоту (витамин В3, ниацин). Второй путь – серотониновый – превращение в серотонин и мелатонин. Третий путь – индольный – образование индольных производных, которые затем выводятся с мочой (Richard et al., 2009). Показано, что нарушения в звеньях кинуренинового пути приводят к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе к повышению АД (Song et al., 2017; Verheyen et al., 2017). Предполагают, что триптофан и кинуренин способствуют вазодилатации посредством участия в аденилатциклазной и гуанилатциклазной системах вторичных внутриклеточных посредников, запуская каскад реакций, приводящих к активации рецепторов оксида азота и снижению концентрации ионов Ca^{2+} в гладкомышечных стенках сосудов (Lincoln et al., 1990; Stasch et al., 2006; Wang et al., 2010).

Концентрации бетаина и триптофана достоверно снижены в сыворотке крови гипертензивных крыс линии НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем, что может говорить о том, что воспалительные процессы играют роль в установлении и поддержании гипертензивного статуса крыс НИСАГ. В последнее время появляется все больше свидетельств о важной роли воспаления сосудистой стенки в патогенезе гипертензивных состояний, в том числе с участием интерлейкинов IL-1β и IL-18 (Patrick et al., 2021).

Метаболиты, связанные с энергетическими процессами

Креатинфосфат является источником быстро мобилизуемой энергии в тканях, где энергетический обмен наиболее интенсивен, – скелетных мышцах, миокарде, мозге. Ввиду

того, что прямой транспорт АТФ через митохондриальную мембрану затруднен, креатинфосфат служит как «челнок», участвуя в транспорте химической энергии между митохондриями и местами использования энергии. АТФ с участием митохондриальной креатинкиназы фосфорилирует креатин в креатинфосфат, который направляется, например, к миофибриллам. Под действием креатинкиназы миофибрилл креатинфосфат фосфорилирует АДФ в АТФ с образованием креатина, который снова возвращается к митохондриям, и цикл повторяется (Bessman, Carpenter, 1985).

Изменения в содержании и соотношении креатина и фосфокреатина в тканях могут быть сигналом различных патологий (Strumia et al., 2012). Показано, что снижение соотношения креатинфосфат/АТФ коррелирует со степенью тяжести сердечной недостаточности (Neubauer et al., 1992) и с выраженностью гипертрофии миокарда (Ye et al., 2001). Известно также, что введение экзогенного креатинфосфата оказывает кардиопротективное действие на ишемизированный миокард (Scattolin et al., 1993; Azova et al., 2015; Zhang et al., 2015). В нашем исследовании у крыс НИСАГ концентрация креатинфосфата в сыворотке крови была повышена почти в три раза по сравнению с нормотензивным контролем. Для определения причины такого различия в периферических концентрациях креатинфосфата требуются дополнительные исследования, включающие оценку содержания креатинфосфата и соотношения креатинфосфат/АТФ в миокарде гипертензивных крыс НИСАГ.

Метаболиты, связанные с синтезом катехоламинов

Тирозин – ароматическая аминокислота, из которой под воздействием фермента тирозингидроксилазы синтезируются катехоламины: дофамин, адреналин, норадреналин. Катехоламины являются главными эффекторами симпатoadrenalовой системы, влияют на сердечный выброс и сосудистое сопротивление (Lee et al., 2016). Основные показатели функции симпатoadrenalовой системы – концентрации катехоламинов и активность тирозингидроксилазы (Yamabe et al., 1973; Moura et al., 2005), но содержание тирозина также может рассматриваться в качестве маркера нарушений синтеза катехоламинов: так, в метаболомном исследовании образцов мочи пациентов с гипертоническим нефросклерозом обнаружено снижение уровней тирозина и дофамина (Ovrehus et al., 2019).

Ранее было показано, что продукция адреналина надпочечниками и норадреналина в мозге повышена у крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG (Markel et al., 2007; Redina et al., 2021), это позволяет предположить, что сниженный уровень тирозина в сыворотке крови крыс НИСАГ является маркером изменений в синтезе катехоламинов.

Заключение

Метаболомный профиль сыворотки крови, маркирующий наличие стресс-зависимой формы артериальной гипертензии, можно описать следующим образом: наблюдаются повышение содержания в сыворотке крови лейцина, изолейцина, валина, мио-инозитола, изобутирата, глутамата, глутамина, орнитина, креатинфосфата и снижение концентраций 2-гидроксиизобутирата, бетаина,

триптофана, тирозина. Повышенные концентрации лейцина, изолейцина, валина и мио-инозитола ассоциированы с метаболизмом глюкозы и инсулинорезистентностью, наблюдаемой у крыс линии НИСАГ (Shorin et al., 1990; Пивоварова и др., 2020). Орнитин играет важную роль в образовании мочевины, а также связан с метаболизмом аргинина и продукцией вазоактивного фактора – оксида азота, следовательно, рассмотрение его в качестве метаболомного маркера патогенеза гипертонической болезни представляется вполне обоснованным. Бетаин характеризуется как соединение с противовоспалительным эффектом при различных патологиях (Zhao et al., 2018), поэтому уменьшение его концентрации в сыворотке крыс НИСАГ может маркировать участие воспалительного процесса в патогенезе артериальной гипертонии. Такую же роль негативного маркера воспалительного процесса может выполнять триптофан в сыворотке крови (Sorgdrager et al., 2019), снижение его у крыс НИСАГ может оказывать противовоспалительный эффект.

Полученные результаты являются отправной точкой для более детального изучения связи указанных метаболомных маркеров с развитием гипертензивного статуса на определенных этапах патогенеза стресс-зависимой формы артериальной гипертонии.

Список литературы / References

- Пивоварова Е.Н., Борисова М.А., Маркель А.Л. Экспериментальная модель метаболического синдрома, сопровождающегося неалкогольной жировой болезнью печени, на гипертензивных крысах НИСАГ с использованием фруктозной нагрузки. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;6(1):10-14. DOI 10.18699/Letters2020-6-02.
- [Pivovarova E.N., Borisova M.A., Markel A.L. Experimental model of metabolic syndrome accompanied by non-alcoholic fatty liver disease in hypertensive ISIAH rats using fructose load. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(1):10-14. DOI 10.18699/Letters2020-6-02. (in Russian)]
- Aa J., Wang G., Hao H., Huang Q., Lu Y., Yan B., Zha W., Liu L., Kang A. Differential regulations of blood pressure and perturbed metabolism by total ginsenosides and conventional antihypertensive agents in spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010;31(8):930-937. DOI 10.1038/aps.2010.86.
- Abou-Saleh H., Pathan A.R., Daalis A., Hubrack S., Abou-Jassoum H., Al-Naeimi H., Rusch N.J., Machaca K. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) receptor up-regulation in hypertension is associated with sensitization of Ca²⁺ release and vascular smooth muscle contractility. *J. Biol. Chem.* 2013;288(46):32941-32951. DOI 10.1074/jbc.M113.496802.
- Akira K., Imachi M., Hashimoto T. Investigations into biochemical changes of genetic hypertensive rats using ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Hypertens. Res.* 2005;28(5):425-430. DOI 10.1291/hyres.28.425.
- Akira K., Masu S., Imachi M., Mitome H., Hashimoto M., Hashimoto T. ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008;46(3):550-556. DOI 10.1016/j.jpba.2007.11.017.
- Andoh A., Tsujikawa T., Fujiyama Y. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr. Pharm. Des.* 2003;9(4):347-358. DOI 10.2174/1381612033391973.
- Arrieta-Cruz I., Su Y., Gutiérrez-Juárez R. Suppression of endogenous glucose production by isoleucine and valine and impact of diet composition. *Nutrients*. 2016;8(2):79. DOI 10.3390/nu8020079.
- Azova M.M., Blagonravov M.L., Frolov V.A. Effect of phosphocreatine and ethylmethylhydroxypyridine succinate on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in left-ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015;158(3):313-314. DOI 10.1007/s10517-015-2749-4.
- Bessman S.P., Carpenter C.L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.* 1985;54(1):831-862. DOI 10.1146/annurev.bi.54.070185.004151.
- Bier A., Braun T., Khasbab R., Di Segni A., Grossman E., Haberman Y., Leibowitz A. A high salt diet modulates the gut microbiota and short chain fatty acids production in a salt-sensitive hypertension rat model. *Nutrients*. 2018;10(9):1154. DOI 10.3390/nu10091154.
- Brindle J.T., Nicholson J.K., Schofield P.M., Grainger D.J., Holmes E. Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst*. 2003;128(1):32-36. DOI 10.1039/B209155K.
- Buzueva I.I., Filyushina E.E., Shmerling M.D., Markel A.L., Yakobson G.S. Age-related structural characteristics of the adrenal medulla in hypertensive NISAG rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006;142(6):651-653. DOI 10.1007/s10517-006-0441-4.
- Byrd J.B. Personalized medicine and treatment approaches in hypertension: current perspectives. *Integr. Blood Press. Control*. 2016;9:59-67. DOI 10.2147/IBPC.S74320.
- Cavaliere H., Meyer K., Geraldo M.-N. Effect of thyroid hormone therapy on plasma insulin-like growth factor I levels in normal subjects, hypothyroid patients and endemic cretins. *Horm. Res. Paediatr.* 1987;25(3):132-139. DOI 10.1159/000180644.
- Chen X.F., Chen X., Tang X. Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases. *Clin. Sci.* 2020;134(6):657-676. DOI 10.1042/CS20200128.
- Croze M.L., Soulage C.O. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*. 2013;95(10):1811-1827. DOI 10.1016/j.biochi.2013.05.011.
- D'Anna R., Santamaria A., Cannata M.L., Interdonato M.L., Giorgianni G.M., Granese R., Corrado F., Bitto A. Effects of a new flavonoid and Myo-inositol supplement on some biomarkers of cardiovascular risk in postmenopausal women: a randomized trial. *Int. J. Endocrinol.* 2014;2014:653561. DOI 10.1155/2014/653561.
- De Meyer T., Sinnaeve D., Van Gasse B., Tsiportkova E., Rietzschel E.R., De Buyzere M.L., Gillebert T.C., Bekeert S., Martins J.C., Van Criekinge W. NMR-based characterization of metabolic alterations in hypertension using an adaptive, intelligent binning algorithm. *Anal. Chem.* 2008;80(10):3783-3790. DOI 10.1021/ac7025964.
- Demougeot C., Prigent-Tessier A., Marie C., Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2005;23(5):971-978. DOI 10.1097/01.hjh.0000166837.78559.93.
- Felizardo R.J.F., Watanabe I.M., Dardi P., Rossoni L.V., Câmara N.O.S. The interplay among gut microbiota, hypertension and kidney diseases: The role of short-chain fatty acids. *Pharmacol. Res.* 2019;141:366-377. DOI 10.1016/j.phrs.2019.01.019.
- Fernández J., Redondo-Blanco S., Gutiérrez-del-Río I., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombo F. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *J. Funct. Foods*. 2016;25:511-522. DOI 10.1016/j.jff.2016.06.032.
- Fomenko M.V., Yanshole L.V., Tsentlovich Y.P. Stability of metabolomic content during sample preparation: blood and brain tissues. *Metabolites*. 2022;12(9):811. DOI 10.3390/metabo12090811.
- Friso S., Carvajal C.A., Fardella C.E., Olivieri O. Epigenetics and arterial hypertension: the challenge of emerging evidence. *Transl. Res.* 2015;165(1):154-165. DOI 10.1016/j.trsl.2014.06.007.
- Giordano D., Corrado F., Santamaria A., Quattrone S., Pintaudi B., Di Benedetto A., D'Anna R. Effects of myo-inositol supplementation in postmenopausal women with metabolic syndrome: a perspective, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*. 2011;18(1):102-104. DOI 10.1097/gme.0b013e3181e8e1b.
- Golzarand M., Bahadoran Z., Mirmiran P., Azizi F. Dietary choline and betaine intake and risk of hypertension development: a 7.4-year

- follow-up. *Food Funct.* 2021;12(9):4072-4078. DOI 10.1039/D0FO03208E.
- Hoffmann T.J., Ehret G.B., Nandakumar P., Ranatunga D., Schaefer C., Kwok P.Y., Iribarren C., Chakravarti A., Risch N. Genome-wide association analyses using electronic health records identify new loci influencing blood pressure variation. *Nat. Genet.* 2017;49(1):54-64. DOI 10.1038/ng.3715.
- Hu W., Sun L., Gong Y., Zhou Y., Yang P., Ye Z., Fu J., Huang A., Fu Z., Yu W., Zhao Y., Yang T., Zhou H. Relationship between branched-chain amino acids, metabolic syndrome, and cardiovascular risk profile in a Chinese population: a cross-sectional study. *Int. J. Endocrinol.* 2016;2016:8173905. DOI 10.1155/2016/8173905.
- Kim S., Goel R., Kumar A., Qi Y., Lobaton G., Hosaka K., Mohammed M., Handberg E.M., Richards E.M., Pepine C.J., Raizada M.K. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clin. Sci.* 2018;132(6):701-718. DOI 10.1042/CS20180087.
- Laurent S. Antihypertensive drugs. *Pharmacol. Res.* 2017;124:116-125. DOI 10.1016/j.phrs.2017.07.026.
- Lee Y.H., Kim Y.G., Moon J.Y., Kim J.S., Jeong K.H., Lee T.W., Ihm C.G., Lee S.H. Genetic variations of tyrosine hydroxylase in the pathogenesis of hypertension. *Electrolyte Blood Press.* 2016;14(2):21-26. DOI 10.5049/EBP.2016.14.2.21.
- Lincoln T.M., Cornwell T.L., Taylor A.E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1990;258(3):C399-C407. DOI 10.1152/ajpcell.1990.258.3.C399.
- Liu X., Zheng Y., Guasch-Ferré M., Ruiz-Canela M., Toledo E., Clish C., Liang L., Razquin C., Corella D., Estruch R., Fito M., Gómez-Gracia E., Arós F., Ros E., Lapetra J., Fiol M., Serra-Majem L., Papandreou C., Martínez-González M.A., Hu F.B., Salas-Salvadó J. High plasma glutamate and low glutamine-to-glutamate ratio are associated with type 2 diabetes: case-cohort study within the PREDIMED trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2019;29(10):1040-1049. DOI 10.1016/j.numecd.2019.06.005.
- Liu Y., Chen T., Qiu Y., Cheng Y., Cao Y., Zha A., Jia W. An ultrasonication-assisted extraction and derivatization protocol for GC/TOFMS-based metabolite profiling. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;400:1405-1417. DOI 10.1007/s00216-011-4880-z.
- Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Yu.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol.* 2007;195(3):439-450. DOI 10.1677/JOE-07-0254.
- Moura E., Costa P.M.P., Moura D., Guimarães S., Vieira-Coelho M.A. Decreased tyrosine hydroxylase activity in the adrenals of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2005;76(25):2953-2964. DOI 10.1016/j.lfs.2004.11.017.
- Natarajan N., Hori D., Flavahan S., Stepan J., Flavahan N.A., Berkowitz D.E., Pluznick J.L. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. *Physiol. Genomics.* 2016;48(11):826-834. DOI 10.1152/physiolgenomics.00089.2016.
- Neubauer S., Krahe T., Schindler R., Horn M., Hillenbrand H., Entzeroth C., Mader H., Kromer E.P., Riegger G.A., Lackner K. 31P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;86(6):1810-1818. DOI 10.1161/01.CIR.86.6.1810.
- Newgard C.B., An J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Stevens R.D., Lien L.F., Haqq A.M., Shah S.H., Arlotto M., Slentz C.A., Rochon J., Gallup D., Ilkayeva O., Wenner B.R., Yancy W.S., Eisensohn H., Musante G., Surwit R.S., Millington D.S., Butler M.D., Svetkey L.P. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;9(4):311-326. DOI 10.1016/j.cmet.2009.02.002.
- Niu W.Q., Zhao H.Y., Zhou L., Dai X.X., Wang D.Y., Cao J., Wang B. Interacting effect of genetic variants of angiotensin II type 1 receptor on susceptibility to essential hypertension in Northern Han Chinese. *J. Hum. Hypertens.* 2009;23(1):68-71. DOI 10.1038/jhh.2008.77.
- Ovrehus M.A., Bruheim P., Ju W., Zelnick L.R., Langlo K.A., Sharma K., de Boer I.H., Hallan S.I. Gene expression studies and targeted metabolomics reveal disturbed serine, methionine, and tyrosine metabolism in early hypertensive nephrosclerosis. *Kidney Int. Rep.* 2019;4(2):321-333. DOI 10.1016/j.ekir.2018.10.007.
- Pang Z., Chong J., Zhou G., de Lima Morais D.A., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P.É., Li S., Xia J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W388-W396. DOI 10.1093/nar/gkab382.
- Patrick D.M., van Beusecum J.P., Kirabo A. The role of inflammation in hypertension: novel concepts. *Curr. Opin. Physiol.* 2021;19:92-98. DOI 10.1016/j.cophys.2020.09.016.
- Redina O.E., Smolenskaya S.E., Polityko Y.K., Ershov N.I., Gilinsky M.A., Markel A.L. Hypothalamic norepinephrine concentration and heart mass in hypertensive ISIAH rats are associated with a genetic locus on chromosome 18. *J. Pers. Med.* 2021;11(2):67. DOI 10.3390/jpm11020067.
- Richard D.M., Dawes M.A., Mathias C.W., Acheson A., Hill-Kapturczak N., Dougherty D.M. L-tryptophan: basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int. J. Tryptophan Res.* 2009;2:45-60. DOI 10.4137/ijtrs.2129.
- Roberts L.D., Koulman A., Griffin J.L. Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(1):65-75. DOI 10.1016/S2213-8587(13)70143-8.
- Sabari B.R., Zhang D., Allis C.D., Zhao Y. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;18(2):90-101. DOI 10.1038/nrm.2016.140.
- Scattolin G., Gabellini A., Desideri A., Formichi M., Caneve F., Corbara F. Diastolic function and creatine phosphate: an echocardiographic study. *Curr. Ther. Res.* 1993;54(5):562-571. DOI 10.1016/S0011-393X(05)80677-0.
- Shorin Yu.P., Markel' A.L., Selyatitskaia V.G., Pal'chikova N.A., Grinberg P.M., Amstislavskii S.Ya. Endocrine-metabolic relations in rats with genetic arterial hypertension. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1990;109(6):575-576. DOI 10.1007/BF00841441.
- Soltis E.E., Newman P.S., Olson J.W. Eflornithine treatment in SHR: potential role of vascular polyamines and ornithine decarboxylase in hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 1994;16(5):595-610. DOI 10.3109/10641969409067964.
- Song P., Ramprasath T., Wang H., Zou M.H. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74(16):2899-2916. DOI 10.1007/s00018-017-2504-2.
- Sookoian S., Pirola C.J. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.* 2012;18(29):3775-3781. DOI 10.3748/wjg.v18.i29.3775.
- Sorgdrager F.J., Naudé P.J., Kema I.P., Nollen E.A., Deyn P.P.D. Tryptophan metabolism in inflammation: from biomarker to therapeutic target. *Front. Immunol.* 2019;10:2565. DOI 10.3389/fimmu.2019.02565.
- Stasch J.P., Schmidt P.M., Nedvetsky P.I., Nedvetskaya T.Y., Kumar A.H.S., Meurer S., Deile M., Taye A., Knorr A., Lapp H., Müller H., Turgay Y., Rothkegel C., Tersteegen A., Kemp-Harper B., Müller-Esterl W., Schmidt H.H.W. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* 2006;116(9):2552-2561. DOI 10.1172/JCI28371.
- Strumia E., Pelliccia F., D'Ambrosio G. Creatine phosphate: pharmacological and clinical perspectives. *Adv. Ther.* 2012;29(2):99-123. DOI 10.1007/s12325-011-0091-4.
- Thoenes M., Neuberger H.R., Volpe M., Khan B.V., Kirch W., Böhm M. Antihypertensive drug therapy and blood pressure control in men and women: an international perspective. *J. Hum. Hypertens.* 2010;24(5):336-344. DOI 10.1038/jhh.2009.76.

- Tobias D.K., Lawler P.R., Harada P.H., Demler O.V., Ridker P.M., Manson J.E., Cheng S., Mora S. Circulating branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in a prospective cohort of US women. *Circ. Genom. Precis. Med.* 2018;11(4):e002157. DOI 10.1161/CIRCGEN.118.002157.
- Toland E.J., Saad Y., Yerga-Woolwine S., Ummel S., Farms P., Ramdath R., Frank B.C., Lee N.H., Joe B. Closely linked non-additive blood pressure quantitative trait loci. *Mamm. Genome.* 2008;19(3):209-218. DOI 10.1007/s00335-008-9093-1.
- Tsentlovich Y.P., Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Yanshole V.V., Odud I.M. Most abundant metabolites in tissues of freshwater fish pike-perch (*Sander lucioperca*). *Sci. Rep.* 2020;10(1):17128. DOI 10.1038/s41598-020-73895-3.
- van Duk G., Scheurink A., Ritter S., Steffens A. Glucose homeostasis and sympathoadrenal activity in mercaptoacetate-treated rats. *Physiol. Behav.* 1995;57(4):759-764. DOI 10.1016/0031-9384(94)00323-8.
- Verheyen N., Meinitzer A., Grübler M.R., Ablasser K., Kolesnik E., Fahrleitner-Pammer A., Belyavskiy E., Trummer C., Schwetz V., Pieske-Kraigher E., Voelkl J., Alesutan I., Catena C., Sechi L.A., Brussee H., von Lewinski D., März W., Pieske B., Pilz S., Tomaschitz A. Low-grade inflammation and tryptophan-kynurenine pathway activation are associated with adverse cardiac remodeling in primary hyperparathyroidism: the EPATH trial. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2017;55(7):1034-1042. DOI 10.1515/cclm-2016-1159.
- Wang T.J., Larson M.G., Vasan R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., O'Donnell C.J., Carr S.A., Motha V.M., Florez J.C., Souza A., Melander A., Clish C.B., Gerszten R.E. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* 2011;17(4):448-453. DOI 10.1038/nm.2307.
- Wang Y., Liu H., McKenzie G., Witting P.K., Stasch J.-P., Hahn M., Changsirivathanathamrong D., Wu B.J., Ball H.J., Thomas S.R., Kapoor V., Celermajer D.S., Mellor A.L., Keaney J.F. Jr., Hunt N.H., Stocker R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat. Med.* 2010;16(3):279-285. DOI 10.1038/nm.2092.
- Wilson C.J., Lee P.J., Leonard J.V. Plasma glutamine and ammonia concentrations in ornithine carbamoyltransferase deficiency and citrullinaemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2001;24(7):691-695. DOI 10.1023/A:1012995701589.
- Yamabe H., De Jong W., Lovenberg W. Further studies on catecholamine synthesis in the spontaneously hypertensive rat: catecholamine synthesis in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 1973;22(1):91-98. DOI 10.1016/0014-2999(73)90188-X.
- Yang J.M., Zhou R., Zhang M., Tan H.R., Yu J.Q. Betaine attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats via inhibiting inflammatory response. *Molecules.* 2018;23(6):1274. DOI 10.3390/molecules23061274.
- Yang M., Yu Z., Deng S., Chen X., Chen L., Guo Z., Zheng H., Chen L., Cai D., Wen B., Wu Q., Liang F. A targeted metabolomics MRM-MS study on identifying potential hypertension biomarkers in human plasma and evaluating acupuncture effects. *Sci. Rep.* 2016;6(1):25871. DOI 10.1038/srep25871.
- Yang T., Santisteban M.M., Rodriguez V., Li E., Ahmari N., Carvajal J.M., Zadeh M., Gong M., Qi Y., Zubcevic J., Sahay B., Pepine C.J., Raizada M.K., Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension.* 2015;65(6):1331-1340. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315.
- Ye Y., Gong G., Ochiai K., Liu J., Zhang J. High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model. *Circulation.* 2001;103(11):1570-1576. DOI 10.1161/01.CIR.103.11.1570.
- Yoon M.S. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. *Nutrients.* 2016;8(7):405. DOI 10.3390/nu8070405.
- Yoshizawa F. New therapeutic strategy for amino acid medicine: notable functions of branched chain amino acids as biological regulators. *J. Pharmacol. Sci.* 2012;118(2):149-155. DOI 10.1254/jphs.11R05FM.
- Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Melnikov A.D., Kudryavtsev I.S., Novoselov V.P., Tsentlovich Y.P. Post-mortem changes in metabolomic profiles of human serum, aqueous humor and vitreous humor. *Metabolomics.* 2020;16(7):80. DOI 10.1007/s11306-020-01700-3.
- Zhang W., Zhang H., Xing Y. Protective effects of phosphocreatine administered post-treatment combined with ischemic post-conditioning on rat hearts with myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Med. Res.* 2015;7(4):242-247. DOI 10.14740/jocmr2087w.
- Zhao G., He F., Wu C., Li P., Li N., Deng J., Zhu G., Ren W., Peng Y. Betaine in inflammation: mechanistic aspects and applications. *Front. Immunol.* 2018;9:1070. DOI 10.3389/fimmu.2018.01070.
- Zhong C., Miao M., Che B., Du J., Wang A., Peng H., Bu X., Zhang J., Ju Z., Xu T., He J., Zhang Y. Plasma choline and betaine and risks of cardiovascular events and recurrent stroke after ischemic stroke. *Am. J. Clin. Nutr.* 2021;114(4):1351-1359. DOI 10.1093/ajcn/nqab199.

ORCID ID

A.A. Seryapina orcid.org/0000-0002-8807-2580
Yu.K. Polityko orcid.org/0000-0003-2343-5085
L.V. Yanshole orcid.org/0000-0002-8265-6446
Yu.P. Tsentlovich orcid.org/0000-0002-1380-3000
A.L. Markel orcid.org/0000-0002-1550-1647

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20025) совместно с Министерством науки Новосибирской области (соглашение № 0000005406995998225120532 p-36 от 06.04.2022).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.11.22. После доработки 01.03.23. Принята к публикации 02.03.23.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции» – реестровая запись СМИ
Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий,
в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой
степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Russian Science Citation Index
на платформе Web of Science, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, Web of Science CC,
Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich’s Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:

русскоязычная версия – на сайте ИЦиГ СО РАН, <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.
Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

