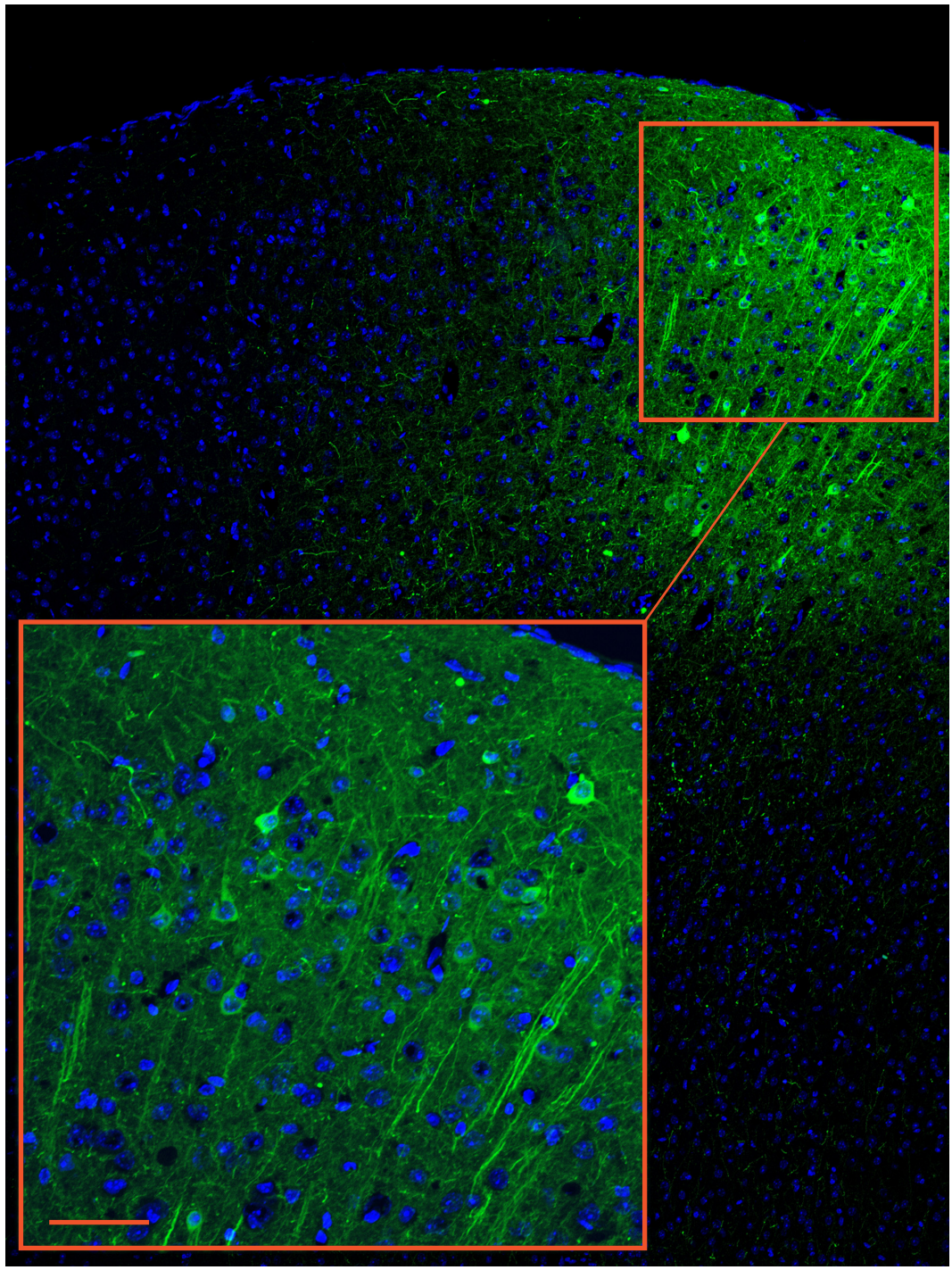
Online ISSN 2500-3259

ВАВИЛОВСКИЙ
ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ
VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2024 • 28 • 4

Генетика растений / Физиологическая генетика / Генетика животных / Медицинская генетика / Компьютерная биология растений



vavilov.elpub.ru
vavilovj-icg.ru
vavilov_journal@bionet.nsc.ru

2024 • 28 • 4

Online ISSN 2500-3259

Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.
Периодичность 8 выпусков в год
DOI 10.18699/vjgb-24-41

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. Рогозин – 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. Шаврукова – 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)

2024 • 28 • 4

Online ISSN 2500-3259

Online edition

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Founded in 1997
Published 8 times annually
DOI 10.18699/vjgb-24-41

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. Bespalova, 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

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ • VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

СОДЕРЖАНИЕ • 2024 • 28 • 4

Генетика растений

365 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Дисомное замещение хромосом 3R(3B) приводит к комплексу аномалий в мейозе мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. *А.А. Журавлева, О.Г. Силкова*

377 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Молекулярно-цитогенетическая характеристика новых интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине. *О.А. Баранова, И.Г. Адонина, С.Н. Сибикеев*

Физиологическая генетика

387 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Трансгенерационное влияние пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла. *А.В. Вьюшина, А.В. Притворова, С.Г. Пивина, Н.Э. Ордян*

398 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Действие амисульприда на экспрессию серотониновых рецепторов, нейротрофического фактора BDNF и его рецепторов при сверхэкспрессии склонного к агрегации тау-белка с мутацией [R406W] у мышей. *Е.М. Кондаурова, А.А. Комарова, Т.В. Ильчибаева, А.Я. Родный, Е.А. Заливина, В.С. Науменко*

Генетика животных

407 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Паттерны экспрессии рецепторов дофамина и основных элементов нейротрофических (BDNF, CDNF) систем в критические периоды онтогенеза в структурах мозга мышей с аутизм-подобным поведением (BTBR) или его отсутствием (C57BL/6 J). *П.Д. Правикова, М.А. Арссан, Е.А. Заливина, Е.М. Кондаурова, Е.А. Куликова, И.И. Белокопытова, В.С. Науменко*

416 ОБЗОР
История, современное состояние и генетическая характеристика локальных пород крупного рогатого скота Республики Казахстан. *А.К. Хамзина, А.А. Юрченко, Н.С. Юдин, П.Ш. Ибрагимов, Е.С. Усенбеков, Д.М. Ларкин*

Медицинская генетика

424 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2* и *CAT*, участвующих в процессах репарации ДНК и антиоксидантной защите, с риском развития рака молочной железы. *А.А. Тимофеева, В.И. Минина, А.В. Торгунакова, О.А. Соболева, Р.А. Титов, Я.А. Захарова, М.Л. Баканова, А.Н. Глушков*

433 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Полиморфизм генов факторов регуляции ангиогенеза (*VEGF/VEGFR*), генов ремоделирования внеклеточного матрикса (*MMP/TIMP*) и уровни соответствующих белков во внеклеточных тканях пациентов с первичной и вторичной лимфедемой. *В.И. Коненков, В.В. Нимаев, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев*

Компьютерная биология растений

443 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Конвейер обработки гиперспектральных изображений на примере исследования зерен ячменя, содержащих меланин. *И.Д. Бусов, М.А. Генаев, Е.Г. Комышев, В.С. Коваль, Т.Е. Зыкова, А.Ю. Глаголева, Д.А. Афонников*

456 ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
Использование метода BLUP для оценки селекционной ценности образцов мягкой яровой пшеницы по содержанию микро- и макроэлементов в зерне. *Н.А. Потапова, А.С. Злобин, И.Н. Леонова, Е.А. Салина, Я.А. Цепилов*

© Сибирское отделение Российской академии наук, 2024
© Институт цитологии и генетики СО РАН, 2024
Вавиловский журнал генетики и селекции, 2024

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII • VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

CONTENTS • 2024 • 28 • 4

Plant genetics

365 ORIGINAL ARTICLE
Disomic chromosome 3R(3B) substitution causes a complex of meiotic abnormalities in bread wheat *Triticum aestivum* L.
A.A. Zhuravleva, O.G. Silkova

377 ORIGINAL ARTICLE
Molecular cytogenetic characteristics of new spring bread wheat introgressive lines resistant to stem rust.
O.A. Baranova, I.G. Adonina, S.N. Sibikeev

Physiological genetics

387 ORIGINAL ARTICLE
Transgenerational effect of prenatal stress on behavior and lipid peroxidation in brain structures of female rats during the estral cycle. *A.V. Vyushina, A.V. Pritvorova, S.G. Pivina, N.E. Ordyan*

398 ORIGINAL ARTICLE
Effect of amisulpride on the expression of serotonin receptors, neurotrophic factor BDNF and its receptors in mice with overexpression of the aggregation-prone [R406W] mutant tau protein.
E.M. Kondaurova, A.A. Komarova, T.V. Ilchibaeva, A.Ya. Rodnyy, E.A. Zalivina, V.S. Naumenko

Animal genetics

407 ORIGINAL ARTICLE
Dopamine receptors and key elements of the neurotrophins (BDNF, CDNF) expression patterns during critical periods of ontogenesis in the brain structures of mice with autism-like behavior (BTBR) or its absence (C57BL/6 J). *P.D. Pravikova, M.A. Arssan, E.A. Zalivina, E.M. Kondaurova, E.A. Kulikova, I.I. Belokopytova, V.S. Naumenko*

416 REVIEW
History, status and genetic characteristics of native cattle breeds from the Republic of Kazakhstan. *A.K. Khamzina, A.A. Yurchenko, N.S. Yudin, P.Sh. Ibragimov, Y.S. Ussenbekov, D.M. Larkin*

Medical genetics

424 ORIGINAL ARTICLE
Polymorphic variants of the *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2*, and *CAT* genes involved in DNA repair processes and antioxidant defense and their association with breast cancer risk.
A.A. Timofeeva, V.I. Minina, A.V. Torgunakova, O.A. Soboleva, R.A. Titov, Ya.A. Zakharova, M.L. Bakanova, A.N. Glushkov

433 ORIGINAL ARTICLE
Polymorphism of angiogenesis regulation factor genes (*VEGF*/*VEGFR*), and extracellular matrix remodeling genes (*MMP*/*TIMP*), and the levels of their products in extracellular tissues of patients with primary and secondary lymphedema. *V.I. Konenkov, V.V. Nimaev, A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev*

Computational plant biology

443 ORIGINAL ARTICLE
A pipeline for processing hyperspectral images, with a case of melanin-containing barley grains as an example.
I.D. Busov, M.A. Genaev, E.G. Komyshev, V.S. Koval, T.E. Zykova, A.Y. Glagoleva, D.A. Afonnikov

456 ORIGINAL ARTICLE
The BLUP method in evaluation of breeding values of Russian spring wheat lines using micro- and macroelements in seeds.
N.A. Potapova, A.S. Zlobin, I.N. Leonova, E.A. Salina, Y.A. Tsepilov

© Siberian Branch RAS, 2024
© Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 2024
Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2024

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):365-376

DOI 10.18699/vjgb-24-42

Дисомное замещение хромосом 3R(3B) приводит к комплексу аномалий в мейозе мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

А.А. Журавлева, О.Г. Силкова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
silkova@bionet.nsc.ru

Аннотация. У линий мягкой пшеницы с интрогрессией чужеродных хромосом создается новый генетический фон, который изменяет экспрессию генов как пшеницы, так и хромосом-доноров родственных видов. На хромосоме 3B пшеницы локализованы гены, участвующие в регуляции мейоза. Целью работы было изучить влияние замещения хромосомы пшеницы 3B гомеологичной хромосомой ржи 3R на регуляцию мейоза у дисомно замещенной линии пшеницы 3R(3B). С помощью иммуноокрашивания с антителами к белку микротрубочек, α-тубулину и центромероспецифичному гистону H3 (CENH3), а также с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации проведен анализ динамики микротрубочкового цитоскелета и поведения хромосом пшеницы и ржи 3R в мейозе линии 3R(3B) (*Triticum aestivum* L. сорт Саратовская 29 × *Secale cereale* L. сорт Онохойская). В результате работы обнаружен комплекс аномалий в динамике микротрубочек и поведении хромосом как в первом, так и во втором делениях. Особенностью метафазы I у линии 3R(3B) являлось уменьшение числа хиазм в сравнении с сортом Саратовская 29 – 34.9 ± 0.62 и 41.92 ± 0.38 соответственно. Гомологи хромосомы ржи 3R в 13.18 % мейоцитов не формировали биваленты. Хромосомы характеризовались различной степенью компактизации, в 53.33 ± 14.62 клетки отсутствовала метафазная пластинка. Установлены нарушения в нуклеации микротрубочек на кинетохорах отдельных бивалентов и в их конвергенции на полюсах деления веретена. Важной особенностью мейоза было асинхронное поведение хромосом во втором делении и наличие диад на стадии телофазы II в 8–13 % мейоцитов в зависимости от изученного пыльника. Таким образом, согласно мейотическому фенотипу линии 3R(3B), на хромосоме 3B сорта Саратовская 29 находятся гены, участвующие в регуляции комплекса мейотических процессов, а замещение хромосомами ржи 3R3R хромосом 3B3B не компенсирует их отсутствия.

Ключевые слова: замещение хромосом; мейоз; FISH; иммуноокрашивание; рожь *Secale cereale* L.; мягкая пшеница *Triticum aestivum* L.

Для цитирования: Журавлева А.А., Силкова О.Г. Дисомное замещение хромосом 3R(3B) приводит к комплексу аномалий в мейозе мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):365-376. DOI 10.18699/vjgb-24-42

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017. Растения были выращены в ЦКП репродукции растений ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017. Анализ препаратов проведен в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Disomic chromosome 3R(3B) substitution causes a complex of meiotic abnormalities in bread wheat *Triticum aestivum* L.

A.A. Zhuravleva, O.G. Silkova

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
silkova@bionet.nsc.ru

Abstract. *Triticum aestivum* L. lines introgressed with alien chromosomes create a new genetic background that changes the gene expression of both wheat and donor chromosomes. The genes involved in meiosis regulation are localized on wheat chromosome 3B. The purpose of the present study was to investigate the effect of wheat chromosome 3B substituted with homoeologous rye chromosome 3R on meiosis regulation in disomically substituted wheat line 3R(3B). Employing immunostaining with antibodies against microtubule protein, α-tubulin, and the centromere-specific histone (CENH3), as well as FISH, we analyzed microtubule cytoskeleton dynamics and wheat and rye 3R chromosomes behavior in 3R(3B) (*Triticum aestivum* L. variety Saratovskaya 29 × *Secale cereale* L. variety Onokhoiskaya) meiosis. The results revealed a set of abnormalities in the microtubule dynamics and chromosome behavior in both first and second divisions. A feature of metaphase I in 3R(3B) was a decrease in the chiasmata number compared with variety Saratovskaya 29, 34.9 ± 0.62 and 41.92 ± 0.38, respectively. Rye homologs 3R in 13.18 % of meiocytes did not form bivalents. Chromosomes were characterized by varying degrees of compaction; 53.33 ± 14.62 cells lacked a metaphase plate. Disturbances were found in microtubule nucleation at the bivalent kinetochores and in their convergence at the spindle division poles. An important feature of meiosis was the asynchronous chromosome behavior in the second

© Журавлева А.А., Силкова О.Г., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

division and dyads at the telophase II in 8–13 % of meiocytes, depending on the anther studied. Considering the 3R(3B) meiotic phenotype, chromosome 3B contains the genes involved in the regulation of meiotic division, and substituting 3B3B chromosomes with rye 3R3R does not compensate for their absence.
Key words: chromosome substitution; meiosis; FISH; immunostaining; rye *Secale cereale* L.; common wheat *Triticum aestivum* L.

For citation: Zhuravleva A.A., Silkova O.G. Disomic chromosome 3R(3B) substitution causes a complex of meiotic abnormalities in bread wheat *Triticum aestivum* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):365-376. DOI 10.18699/vjgb-24-42

Введение

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. характеризуется толерантностью к включению в ее геном генетического материала родственных диких и возделываемых видов. Чужеродные хромосомы или их фрагменты могут привнести полезные признаки, например устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, что широко используется в селекционных программах (Юдина и др., 2014; Mohammed et al., 2014; Крупин и др., 2019). Однако включение чужеродных хромосом может приводить к изменению регуляции базовых биологических процессов, таких как мейотическое деление, начиная с гибридов первого поколения (Loginova et al., 2020).

Регуляция мейоза у пшеницы имеет свои особенности. Несмотря на то что этот вид является гетерогексаплоидом ($2n$ = 42, геном AABBDD), в мейозе хромосомы ведут себя как в диплоидном организме. Контроль спаривания хромосом осуществляется генами *Ph* (*Pairing homoeologous*). На хромосоме 5BL локализован ген *Ph1*, супрессирующий гомеологичное спаривание в мейозе (Sears, 1977; Giorgi, 1978), на хромосоме 3DS – ген *Ph2* с более слабым эффектом (Mello-Sampayo, 1971). Локус *Ph1* размером 2.5 MB содержит субтеломерный гетерохроматин, встроенный в кластер *CDK2*-подобных генов (Griffiths et al., 2006; Al-Kaff et al., 2008; Martín et al., 2017). В сегмент гетерохроматина во время периода полиплоидизации пшеницы был встроен ген, первоначально обозначенный как *hypothetical 3* (*Hyp3*) (Griffiths et al., 2006; Al-Kaff et al., 2008), а позднее по мейотическому фенотипу мутантов *ph1b* мягкой пшеницы реаннотированный как *ZIP4* (*TaZIP4-B2*) (UniProtKB–Q2L3T5) (Martín et al., 2017). Таким образом, *TaZIP4-B2* отвечает за осуществление гомологичного и ограничения гомеологичного кроссинговера, в том числе посредством участия в формировании синаптонемного комплекса (Martín et al., 2017, 2018).

По результатам секвенирования генома мягкой пшеницы было выявлено филогеномное происхождение *ZIP4* (Appels et al., 2018). Показано, что *ZIP4* является трансдупликацией локуса хромосомы 3B, инпаралоги которого находятся на хромосомах 3A и 3D. Таким образом, гексаплоидная пшеница несет четыре копии *ZIP4*: по одной копии на каждой из хромосом группы 3 (3A, 3B, 3D) и четвертую дублированную копию на хромосоме 5B. Ранее при создании анеуплоидных линий сорта мягкой пшеницы Chinese Spring было установлено, что отсутствие хромосомы 3B вызывает мейотический асинапсис и снижает фертильность растений (Sears, 1954). Позднее результаты по снижению фертильности были подтверждены, а ген локализован на длинном плече 3BL (Bassi et al., 2013). Потеря хромосомы 3B приводит к снижению спаривания и уменьшению количества хиазм в мейозе, при этом делеция на коротком плече хромосомы 3B имеет не такой выраженный эффект, как делеция на длинном плече (Darrier et al., 2022). Ген десинапсиса не имеет официального обозначения у пшеницы (McIntosh et al., 2013), и, учитывая его вероятное синтетическое родство с *des2* на хромосоме 3H ячменя (Ramage, Hernandez-Soriano, 1972), было предложено обозначение *Tdes2*, где “des” означает desynaptic, а “T” – Triticum (Bassi et al., 2013). На хромосоме 3B также был идентифицирован QTL *QTug.sau-3B*, отвечающий за формирование нередуцированных гамет у межвидовых гибридов (Hao et al., 2014). В целом на хромосоме 3B модельного сорта Chinese Spring локализовано 16 мейотических генов (Darrier et al., 2022). Кроме этого, показано, что ортологи мейотических генов пшеницы взаимодействуют с *TaZIP4* хромосом 3-й группы в различных процессах мейоза (Alabdullah et al., 2019).

Помимо мейотических генов, на хромосомах 3-й гомеологичной группы пшеницы находятся гены, отвечающие за такие важные агрономические признаки, как урожайность, масса зерна, цвет и форма зерна, продолжительность периода покоя семян, устойчивость к заболеваниям *Stagonospora nodorum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *P. recondita*, и за синтез некоторых изозимов (Munkvold et al., 2004). На хромосоме 3BL также локализован QTL выполненности стебля, *Qss.msub-3BL*, который контролирует устойчивость к срезанию пилильщиками соломины у твердой и мягкой пшеницы (Cook et al., 2004). Всего на хромосоме 3B локализовано 6000 генов (Paux et al., 2006). На этой хромосоме обнаружена недавняя в эволюционном измерении (100 тыс. лет тому назад) крупная амплификация LTR ретротранспозонов (Ling et al., 2018), которая может вызывать изменения в структуре и экспрессии генов (Bariach et al., 2020). Следовательно, замещения по хромосоме 3B или ее отсутствие будут оказывать влияние на развитие гибридного генотипа. Кроме того, у линий с дополненными чужеродными хромосомами и замещениями хромосом пшеницы чужеродными хромосомами происходят изменения в экспрессии генов как пшеницы, так и чужеродных хромосом (Rey et al., 2018; Dong et al., 2020).

В связи с этим актуально изучить, как замещение хромосомы пшеницы 3B хромосомой ржи 3R влияет на регуляцию мейоза у дисомно замещенной линии мягкой пшеницы 3R(3B) (*Triticum aestivum* L. сорт Саратовская 29 – *Secale cereale* L. сорт Онохойская) (Silkova et al., 2006). Для этого нами проведен анализ динамики микротрубочкового цитоскелета, изучены прохождение мейотического цикла и поведение хромосом пшеницы и хромосомы ржи 3R.

Таблица 1. Методы, использованные в цитогенетическом анализе растений линии 3R(3B) и сорта Саратовская 29

Метод	Линия 3R(3B)		Сорт Саратовская 29	
	Изучено		Изучено	
	колосьев	мейоцитов	колосьев	мейоцитов
Окрашивание 3 % ацетокармином, фиксатор Навашина	11	982	6	470
Окрашивание 3 % ацетокармином, фиксатор – этиловый спирт 96 % : ледяная уксусная кислота (3:1)	5	534	5	456
Иммуноокрашивание	5	648	5	573
Геномная *in situ* гибридизация (GISH)	5	431	–	–

Материалы и методы

Растительный материал. В работе были использованы мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. сорт Саратовская 29 (С29) и дисомно замещенная пшенично-ржаная линия 3R(3B) (*T. aestivum* L. сорт Саратовская 29 × *Secale cereale* L. сорт Онохойская), где 3B хромосома пшеницы была замещена на 3R хромосому ржи (Silkova et al., 2006) (табл. 1). Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы ФИЦ ИЦиГ СО РАН при температурном режиме день/ночь 24/18 °С и фотопериоде день/ночь 16/8 ч.

Цитогенетический анализ

Окрашивание ацетокармином. Рутинное изучение динамики микротрубочек (МТ) цитоскелета в мейозе сорта С29 и линии 3R(3B) проводили по ранее описанной методике (Loginova et al., 2020). Незрелые колосья фиксировали модифицированным фиксатором Навашина (Wada, Kusunoki, 1964). Анализировались мейоциты на всех стадиях первого и второго делений микроспорогенеза (см. табл. 1).

Для изучения спаривания хромосом в мейозе сорта С29 и линии 3R(3B) незрелые колосья фиксировали в смеси «уксусная кислота : этиловый спирт 96 %» в соотношении 1:3 (по объему). В каждом пыльнике анализировали все поддающиеся оценке мейоциты на стадиях метафазы I и анафазы I (см. табл. 1).

Препараты исследовали при помощи микроскопа Leica DM 2000 (Leica Microsystems), изображения регистрировали камерой DFC 295 (Leica Microsystems).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) и непрямое иммуноокрашивание. Приготовление препаратов и FISH делали по описанной ранее методике (Loginova et al., 2020). Анализировались мейоциты на стадиях метафазы I и телофазы II. В работе использовали пробу pAet6-09, специфичную для центромерных районов хромосом риса, пшеницы, ржи и ячменя (Zhang et al., 2004), и геномную ДНК ржи. Образец ДНК повтора pAet6-09 любезно предоставлен Dr. A. Lukaszewcki (Университет Риверсайд, Калифорния, США). Пробу pAet6-09 метили дигоксигенином (digoxigenin-11-dUTP) при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Суммарную ДНК ржи метили ник-трансляцией (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, cat. no. 18160-010) с биотином (biotin-16-dUTP). Зонды были использованы совместно в различных пропорциях и смешивались с блокирующей пшеничной ДНК. Препараты заключали в среду Vectashield antifade solution (Vector Laboratories No. X1215), замедляющую выцветание флуоресценции, содержащую 1 мкг/мл DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, No. D9542, США) для окрашивания хроматина.

Приготовление препаратов и непрямое иммуноокрашивание проводили как описано ранее (Loginova et al., 2020). Использовались первичные антитела к α-тубулину (Monoclonal Anti-α-Tubulin antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich, No. T5168) (разведение 1:2000) и антитела, специфичные к белку кинетохора CENH3 – варианту центромерного гистона H3 злаков (любезно предоставлены Dr. A. Houben, IPK, Гатерслебен, Германия), разведение 1:850 в 1xPBS буфере с 1 % BSA. Вторичные антитела к CENH3 были антикроличьими родамин конъюгированными (Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, No. 111-025-003) (разведение 1:100); вторичные антитела к α-тубулину были антимышиными IgG конъюгированными с FITC (Sigma, разведение 1:100). Препараты заключали в среду Vectashield antifade solution (Vector Laboratories No. X1215), замедляющую выцветание флуоресценции, содержащую 1 мкг/мл DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, No. D9542, США) для окрашивания хроматина.

Исследование проводили с помощью микроскопа Axio Imager M1 (Carl Zeiss AG, Германия), изображения регистрировались камерой ProgRes MF (Meta Systems, Jenoptic, Германия) с ПО Isis software (Meta Systems, Jenoptic); а также лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) с камерой AxioCam MRm (Zeiss) и ПО ZEN (Zeiss). Полученные изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS2.

Результаты

Динамика хроматина и микротрубочкового цитоскелета в профазе первого деления мейоза у растений сорта С29 и линии 3R(3B)

Сравнительный анализ прохождения стадий профазы у сорта пшеницы С29 и у линии 3R(3B) не выявил различий до ранней зиготены (Приложение 1 и 2)[1]. Со стадии ранней лептотены до начала зиготены мейоциты у пшеницы С29 и линии 3R(3B) меняли форму от прямоугольной (см. Приложение 1, *а*, *в*, Приложение 2, *а*, *г*) и треугольной (см. Приложение 1, *б*, Приложение 2, *в*) до округлой (см. Приложение 1, *г*, Приложение 2, *б*).

[1] Приложения 1–7 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx13.pdf

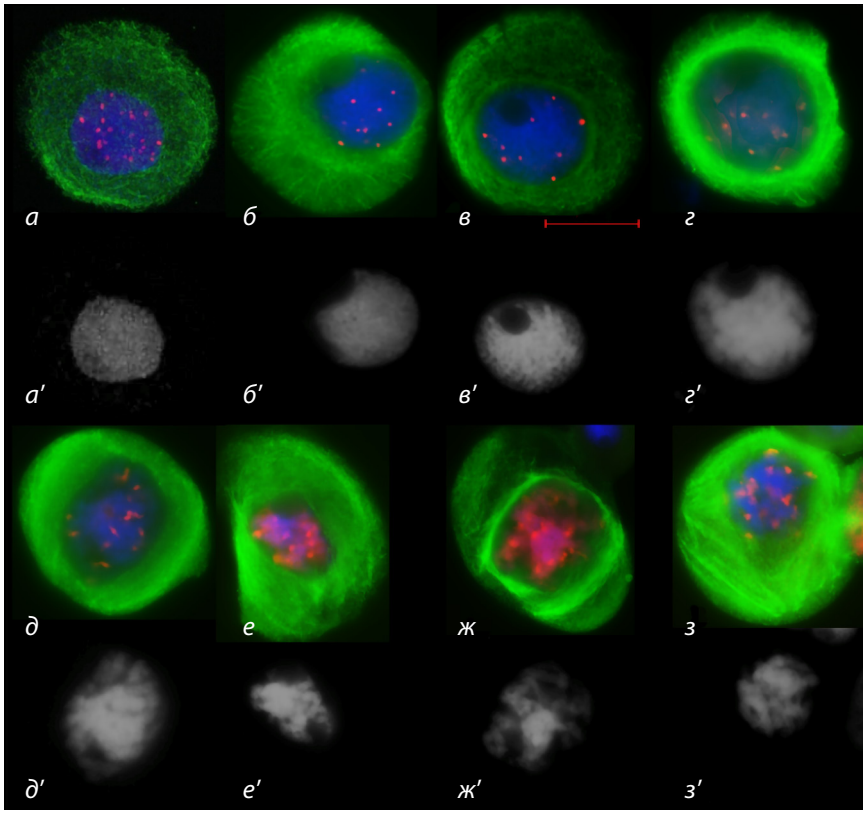


Рис. 1. Реорганизация МТ цитоскелета в профазе первого деления мейоза у линии 3R(3B). *а* – лептотена–зиготена, профазный ретикулярный цитоскелет; *б* – зиготена, микротрубочки приближаются к ядру, образуют перинуклеарное кольцо; *в* – пахитена, плотное кольцо микротрубочек; *г* – диплотена, микротрубочки сформировали плотное кольцо вокруг ядра; *д–з* – диакинез, последовательные стадии дезорганизации кольца и переориентация МТ, формирование про-веретена.

Иммуноокрашивание: ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм. *а′–з′* – окрашивание DAPI.

В ранней лептотене присутствовали три (см. Приложение 1, *а*, *б*, Приложение 2, *б*) или четыре ядрышка, которые позже сливались в одно (см. Приложение 1, *в*, *г*, Приложение 2, *д*). На стадии «лептотена–зиготена» тонкие нити хроматина формировали плотный шар, в который было погружено одно ядрышко, смещенное к оболочке ядра (рис. 1, *а′*, *б′*) (см. Приложение 1, *г*, Приложение 2, *д*). По мере созревания мейоцитов хроматин конденсировался. На стадии зиготены было заметно утолщение его нитей (см. Приложение 1, *г*, Приложение 2, *д–ж*).

На стадиях зиготены и пахитены хроматин у сорта пшеницы С29 и у линии 3R(3B) распределялся в ядре по-разному. У линии 3R(3B), в отличие от С29, нити хроматина выпетливались радиально и нерегулярно (см. Приложение 2, *и*, *к*). На стадии пахитены в случае как пшеницы, так и пшенично-ржаной линии была характерна асимметричная группировка хромосом на одной стороне ядра (см. Приложение 1, *д*, Приложение 2, *з*). На стадии диплотены нити хроматина еще более укорачивались, продолжая контактировать с оболочкой ядра (см. Приложение 1, *е*, *ж*, Приложение 2, *м*). В диакинезе полностью были сформированы биваленты, но еще сохранялись ядрышко и ядерная

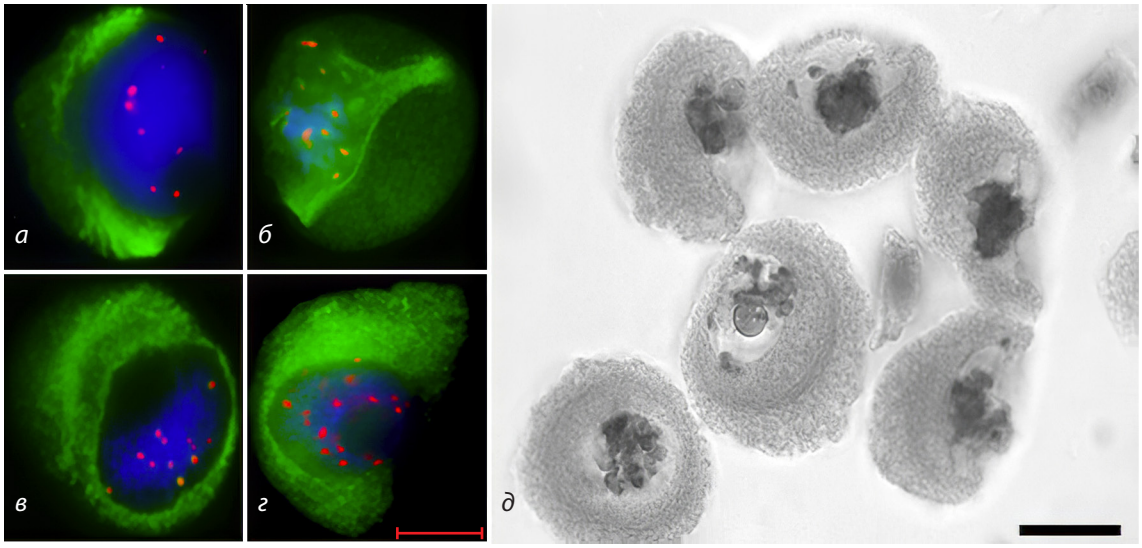


Рис. 2. Миграция ядра к периферии клетки и формирование МТ структур, подобных арке в профазе мейоза у линии 3R(3B). *а*, *г* – арка, образованная МТ; *б* – МТ на вершине арки образуют конгломерацию, подобную полюсу веретена деления; *в* – неполная миграция ядра к периферии; *д* – группа клеток, в части которых произошла миграция ядра к оболочке мейоцита.

Иммуноокрашивание (*а–г*): ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм. Фиксатор Навашина (*д*), окраска ацетокармином. Масштабный отрезок 10 мкм.

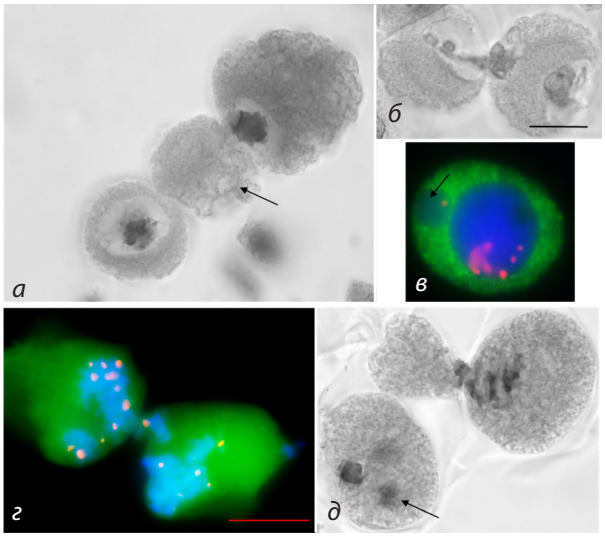


Рис. 3. Цитомиксис у пшенично-ржаной замещенной линии 3R(3B). *а* – перемещение ядра в профазе с образованием цитопласта (указан стрелкой); *б* – процесс перемещения хроматина из одного мейоцита в другой; *в* – микроядро (указано стрелкой); *г* – перемещение хромосомы из одного мейоцита в другой в поздней профазе; *д* – цитомиксис на стадии метафазы I.

Фиксатор Навашина, окрашивание ацетокармином (*а*, *б*, *д*). Масштабный отрезок 10 мкм. Иммуноокрашивание (*в*, *г*): ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм.

оболочка (см. Приложение 1, *з*, Приложение 2, *н*, *о*). У линии 3R(3B), в отличие от C29, на стадии диакинеза хромосомы располагались плотно друг к другу (см. Приложение 1, *з*, Приложение 2, *о*).

Анализ мейоцитов с помощью иммуноокрашивания в профазе до стадии пахитены не выявил различий в динамике МТ между линией 3R(3B) и описанной у сорта C29 ранее (Loginova et al., 2020). На стадии интерфазы и ранней профазы формировался ретикулярный цитоскелет (см. рис. 1, *а*), затем МТ реорганизовывались в радиальные, после чего переориентировались, приближались к ядру на стадии зиготены–пахитены. В это время ядро мигрировало к оболочке и формировалась “half-moon” структура из микротрубочек (см. рис. 1, *б*).

На стадии пахитены вокруг ядра появлялось плотное перинуклеарное кольцо (см. рис. 1, *в*), которое занимало центральную позицию в клетке. В 10–90 % клеток, в зависимости от проанализированного пыльника, ядро мигрировало вплотную к оболочке клетки, а цитоскелет формировал структуру, напоминающую арку (рис. 2, *а*, *в*, *г*). Плотность нуклеации МТ в данной структуре могла различаться. Были обнаружены мейоциты, в которых МТ на вершине арки образовывали структуру, подобную полюсу веретена (см. рис. 2, *б*).

В диплотене–диакинезе происходили дезорганизация кольца и разделение микротрубочек на отдельные пучки, а затем их выпрямление (см. рис. 1, *д*–*ж*). В диакинезе были сформированы трех-четырехполюсные структуры (см. рис. 1, *ж*, *з*), как у сорта C29 и ржи (Loginova et al., 2020).

Миграция ядра к мембране в 5 % клеток у линии 3R(3B) завершалась перемещением хроматина из одного мейоцита в другой в результате цитомиксиса (рис. 3, табл. 2). Хроматин перемещался как на стадии профазы (см. рис. 3, *а*, *б*, *г*), так и на стадии метафазы I (см. рис. 3, *д*). В тех клетках, откуда перемещался хроматин, оставался только цитопласт (см. рис. 3, *а*) или редуцированное количество хроматина. В клетках, куда перемещался хроматин, он формировал отдельное микроядро (см. рис. 3, *в*) либо сливался с ядерным материалом реципиента (см. рис. 3, *д*).

Таблица 2. Частота цитомиксиса у растений сорта C29 и линии 3R(3B)

Линия/сорт	Количество проанализированных клеток		Процентное содержание клеток
	всего	с цитомиксисом или его последствиями	
3R(3B)	480	24	5.0
C29	321	3	0.9

Поведение хромосом и динамика МТ цитоскелета в первом делении мейоза у растений сорта C29 и линии 3R(3B)

После разрушения ядерной оболочки профазное веретено разбиралось, и на стадии прометафазы у растений сорта C29 и линии 3R(3B) микротрубочки взаимодействовали с кинетохорами хромосом и друг с другом, формируя центральные и кинетохорные фибриллы будущего веретена деления (рис. 4).

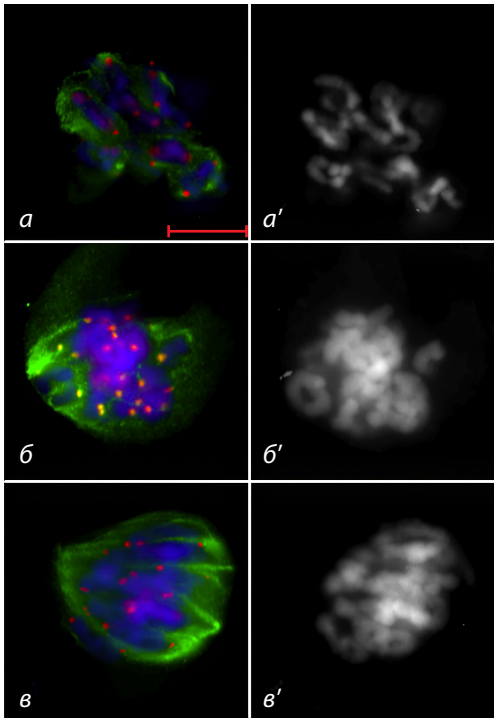


Рис. 4. Прометафаза I мейоза у растений линии 3R(3B). *а* – взаимодействие МТ с кинетохорами хромосом; *б*, *в* – формирование центральных и кинетохорных фибрилл веретена деления.

Иммуноокрашивание: ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм. Окрашивание DAPI (*а′*–*в′*).

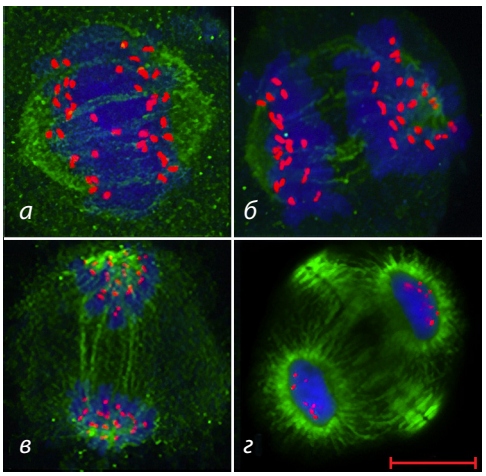


Рис. 5. Реорганизация МТ цитоскелета в первом делении мейоза у линии 3R(3B). *а* – метафаза, сформировано веретено деления; *б* – анафаза, расхождение хромосом к полюсам, укорочение кинетохорных фибрилл веретена деления; *в* – поздняя анафаза, сохраняются только центральные фибриллы веретена деления, начало формирования радиального цитоскелета; *г* – телофаза, формирование фрагмопласта.

Иммуноокрашивание: ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм.

Концы микротрубочек конвергировали на полюсах, в результате формировался аппарат деления и хромосомы располагались на экваторе клетки (рис. 5, *а*).

Отличительной особенностью метафазы I у линии 3R(3B) являлось отсутствие метафазной пластинки на экваторе веретена деления и различная степень компактизации хромосом (Приложение 3, см. рис. 13). Мейоцитов с отсутствием метафазной пластинки обнаружено от 20 до 100 % в зависимости от проанализированного пыльника, в среднем 53.33 ± 14.62 % (см. Приложение 3, *а–д*).

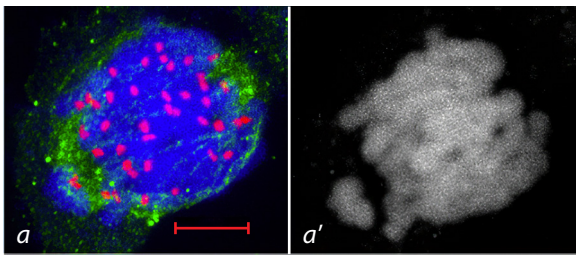


Рис. 6. Отсутствие метафазной пластинки в метафазе I у линии 3R(3B).

Иммуноокрашивание: ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм. Окрашивание DAPI (*а'*).

Анализ поведения хромосом у линии 3R(3B) с помощью иммуноокрашивания выявил, что биваленты в клетках с несформированной метафазной пластинкой хаотично распределены по экваториальной плоскости (рис. 6, *а*), в отличие от нормы (см. рис. 5, *а*), вследствие отсутствия нуклеации МТ на кинетохорах отдельных бивалентов (рис. 7, *а*, рис. 8, *а*) либо аномального соединения кинетохор открытого и закрытого бивалентов пучками МТ (см. рис. 7, *а*). Обнаружены мейоциты, в которых не формировалось нормальное веретено деления из-за отсутствия конвергенции МТ на полюсе (в 2 % мейоцитов) (см. рис. 7, *б*).

Характерной особенностью метафазы I у линии 3R(3B) был сниженный уровень формирования хиазм в сравнении с сортом С29 (табл. 3, см. Приложение 3). Открытых бивалентов обнаружено 3.0 ± 0.35 на клетку, закрытых бивалентов – 15.95 ± 0.61, а число унивалентов составило 3.79 ± 1.0 (см. табл. 3). У сорта С29 униваленты не найдены, число закрытых бивалентов составило 20.92 ± 0.04, открытых – 0.08 ± 0.04 (см. табл. 3). В 1.2 % мейоцитов у линии 3R(3B) были выявлены мультиваленты.

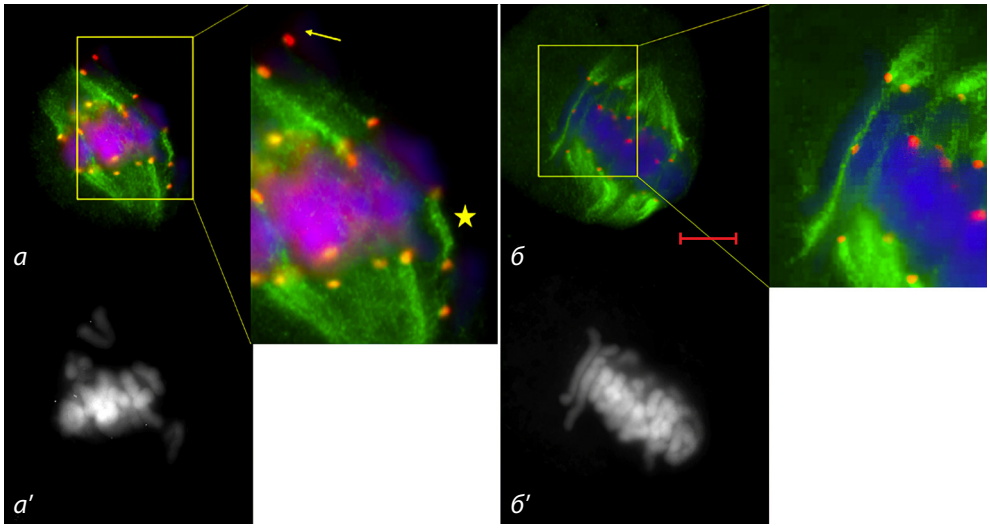


Рис. 7. Нарушения в нуклеации МТ при формировании веретена деления в метафазе I. *а* – на кинетохоре открытого бивалента отсутствует нуклеация МТ (указано стрелкой), пучки МТ соединяют кинетохоры открытого и закрытого бивалентов (отмечено звездочкой); *б* – МТ бивалентов не конвергируют на полюсах.

Иммуноокрашивание: ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм. Окрашивание DAPI (*а'*, *б'*).

Таблица 3. Формирование бивалентов и унивалентов в мейозе у линии 3R(3B) и сорта пшеницы C29

Линия/сорт	Среднее число на клетку			
	закрытых бивалентов	открытых бивалентов	унивалентов	хиазм
3R(3B)	15.95 ± 0.6	3.00 ± 0.35	3.79 ± 1.02	34.90 ± 0.62
C29	20.92 ± 0.04***	0.08 ± 0.04***	0	41.92 ± 0.38

*** Достоверные различия при $p \leq 0.001$.

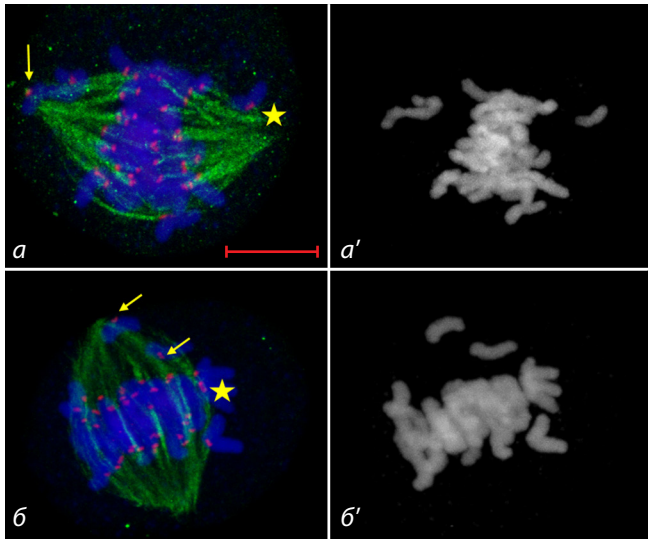


Рис. 8. Распределение унивалентов на стадии метафазы I у линии 3R(3B). *а* – МТ связь унивалентов с одним полюсом (отмечено звездочкой), отсутствие сигнала α-тубулина на кинетохоре бивалента (указано стрелкой); *б* – на кинетохорах унивалентов отсутствует сигнал α-тубулина (указано стрелками), разъединенные сестринские кинетохоры биполярно ориентированы (отмечено звездочкой).

Иммуноокрашивание: ДНК окрашена синим цветом, микротрубочки – зеленым, кинетохоры центромерного района – красным. Масштабный отрезок 5 мкм. Окрашивание DAPI (*а′*, *б′*).

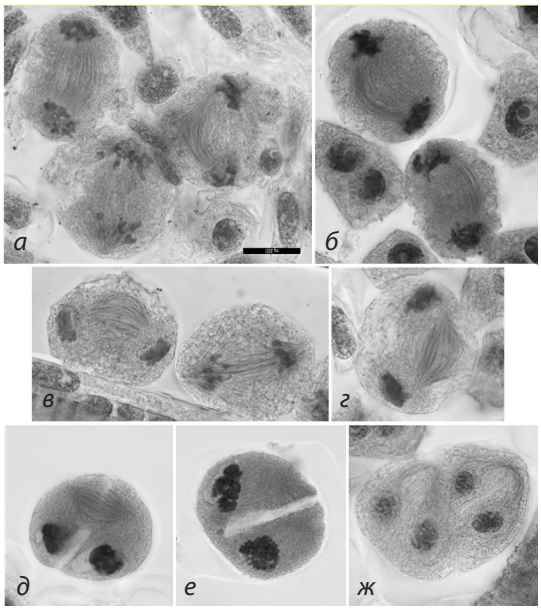


Рис. 9. Формирование С-образного веретена у линии 3R(3B). *а–в* – анафаза; *г* – телофаза, автономное расположение веретена деления; *д*, *е* – телофаза, клеточная стенка в виде надсечки; *д* – автономное расположение веретена деления; *ж* – телофаза II.

Фиксация по Навашину, окраска ацетокармином. Масштабный отрезок 10 мкм.

Сестринские кинетохоры унивалентных хромосом во время метафазы I могли быть разделены или оставаться единой структурой. В первом случае хромосомы располагались на экваторе (см. рис. 8, *б*), а во втором – случайным образом распределялись к полюсам до начала анафазы I (см. рис. 8, *а*). На едином кинетохоре унивалента (см. рис. 8, *б*) и бивалента (см. рис. 8, *а*) нуклеация МТ могла отсутствовать, что тоже влияло на аномальное формирование метафазной пластинки.

В начале анафазы I у растений сорта C29 и линии 3R(3B) кинетохорные фибриллы веретена деления укорачивались, что приводило к расхождению хромосом к полюсам (Приложение 4, *б*, *в*, Приложение 5, *б*, *в*). Хромосомы распределялись по веретену деления вне зависимости от своей компактизации (см. Приложение 5, *б*). После расхождения хромосом формировалась система «фрагмопласт–клеточная пластинка» (см. Приложение 4, *г*, Приложение 5, *г*), которая делила мейоцит на две дочерние клетки. Первое деление заканчивалось образованием диады с радиальным цитоскелетом (см. Приложение 4, *д*, Приложение 5, *д*).

У линии 3R(3B) на стадиях метафазы I и анафазы I (от 0 до 30 % мейоцитов в зависимости от пыльника) и телофазы II обнаружены С-образные веретена (рис. 9, *а–г*, *ж*), которые не влияли на расхождение хромосом.

После расхождения хромосом веретено деления сохраняло свою форму и располагалось возле двух телофазных групп хромосом (см. рис. 9, *в–д*). Процесс формирования фрагмопласта был нарушен, клеточная стенка образовывалась в виде надсечки, которая не разделяла полностью мейоцит на стадии телофазы I (см. рис. 9, *д*, *е*).

Второе деление мейоза у растений сорта C29 и линии 3R(3B)

Анализ второго деления показал, что у линии 3R(3B), в отличие от сорта C29, наряду с нормальным мейозом встречаются пыльники с аномалиями, так же как и в первом делении. В норме во время профазы второго деления радиальный цитоскелет (Приложение 6, *а*) преобразовывался в пучки МТ, которые образовывали метафазную структуру (см. Приложение 6, *б*, *в*, Приложение 7, *б*, *в*), а затем распределяли сестринские хроматиды между полюсами (см. Приложение 6, *г*, Приложение 7, *г*).

Аналогичным образом, как и в первом делении, формируется система «фрагмопласт–клеточная пластинка». При этом сохраняются только центральные фибриллы ве-

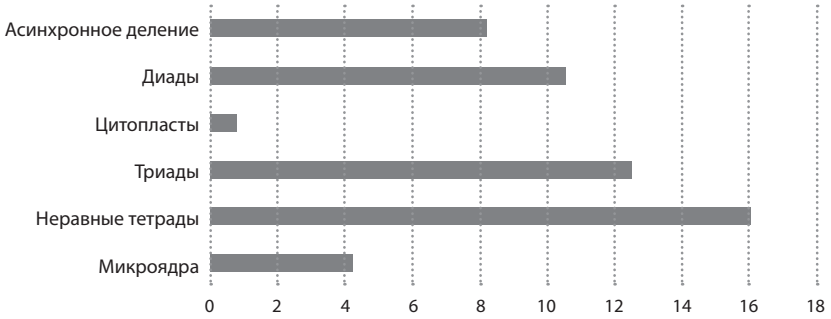


Рис. 10. Процентное содержание клеток с различными аномалиями во втором делении мейоза у линии 3R(3B).

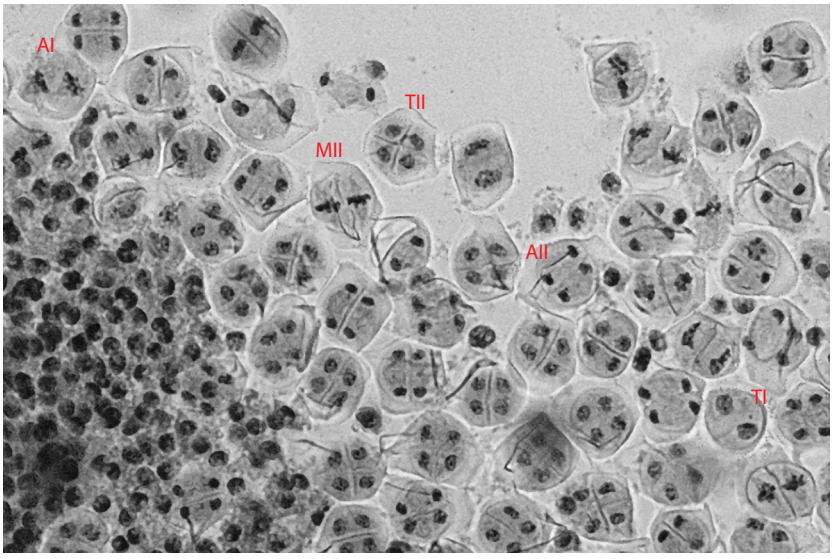


Рис. 11. Асинхронное поведение хромосом у линии 3R(3B). Клетки на разных стадиях мейотического деления в одном пыльнике.

AI – анафаза I, TI – телофаза I, MII – метафаза II, AII – анафаза II, TII – телофаза II. Фиксация по Навашину, окраска ацетокармином.

ретена деления и деление завершается образованием тетрад (см. Приложение 6, *д*, *е*, Приложение 7, *д*, *е*). В 4.2 % тетрад обнаружены микроядра (рис. 10).

Во втором делении у линии 3R(3B) выявлено асинхронное поведение хромосом (рис. 10 и 11). В отдельных пыльниках одного колоса одновременно могли находиться мейоциты на различных стадиях деления: анафаза I, телофаза I, метафаза II, анафаза II и тетрады (см. рис. 11). На стадии телофазы II среди тетрад встречались диады (от 8 до 13 % мейоцитов у проанализированного пыльника) (см. рис. 10).

На стадии телофазы II были обнаружены тетрады с неравными по размеру ядрами (рис. 12, *а*) в 10–20 % мейоцитов (см. рис. 10), а также цитопласты без ядер (2.4 % клеток) (см. рис. 10 и 12, *в*) и триады (12.5 % клеток) (см. рис. 10 и 12, *г–е*).

Поведение хромосом ржи 3R3R в первом и втором делениях мейоза

С помощью FISH было изучено поведение хромосом ржи. На стадии метафазы I хромосомы 3R3R формировали биваленты в 86.82 % мейоцитов, из них в 21.36 % – открытые биваленты, а в 13.18 % мейоцитов – унивалентны (рис. 13). В 5.58 % клеток хромосома 3R отсутствовала.

Во время телофазы I гомологичные хромосомы 3R3R в 98 % мейоцитов расходились без нарушений (рис. 14, *а*). При анализе клеток на стадии телофазы II хромосома 3R была выявлена во всех микроспорах тетрады (см. рис. 14, *б*), что говорит о ее правильном распределении как в случае бивалента, так и в случае унивалентов.

Обсуждение

Хромосома 3B необходима для формирования хиазм между гомологами, а ее отсутствие не компенсируется хромосомой ржи 3R

Образование хиазм между гомологами и одновременный запрет формирования хиазм между гомеологичными хромосомами у мягкой пшеницы контролируются геном *TaZIP4-B2*, идентифицированным внутри локуса *Ph1*, который расположен на длинном плече хромосомы 5B (Griffiths et al., 2006; Al-Kaff et al., 2008; Martín et al., 2017). Однако результаты ци-

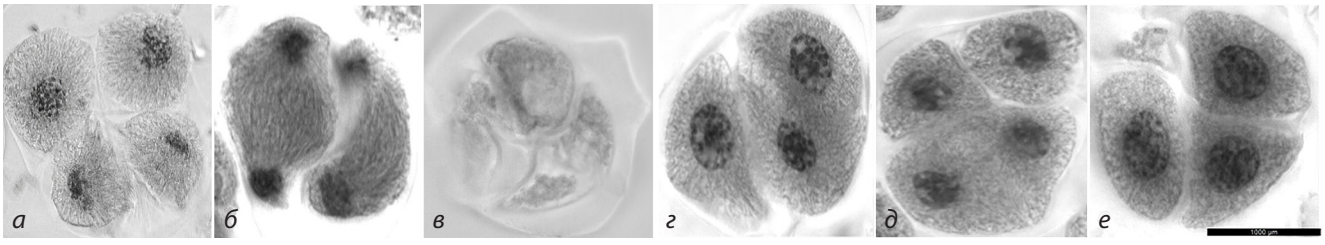


Рис. 12. Аномалии во втором делении мейоза на стадии тетрад у 3R(3B). *а* – тетрада с неравными по размеру ядрами; *б* – аномальное веретено во втором делении, диспропорция хроматина; *в* – безъядерная тетрада; *г*, *е* – триады; *д* – отсутствие клеточной стенки в одной из двух клеток.

Фиксация по Навашину, окраска ацетокармином. Масштабный отрезок 10 мкм.

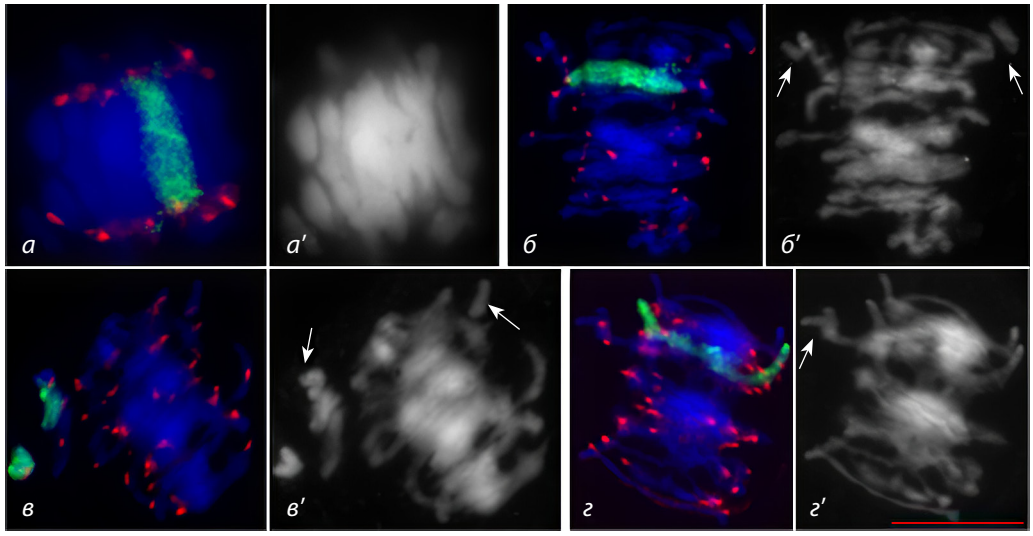


Рис. 13. Поведение хромосом в метафазе I мейоза у линии 3R(3B). *а* – формирование закрытого бивалента хромосомами 3R, нормальное расположение хромосом на экваторе; *б–г* – нарушение компактизации хромосом: *б* – формирование закрытого бивалента хромосомами 3R, унивалентны хромосом пшеницы (указаны стрелками); *в* – унивалентны хромосом ржи, унивалентны хромосом пшеницы (указаны стрелками); *г* – формирование открытого бивалента хромосомами 3R, унивалент пшеницы (указан стрелкой).

GISH: ДНК окрашена синим цветом, хромосомы ржи – зеленым; центромерный район – красным. Масштабный отрезок 5 мкм.

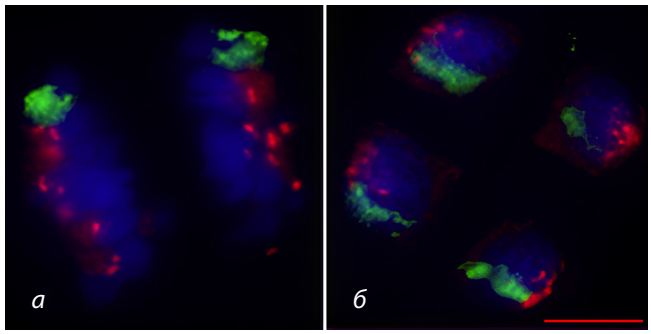


Рис. 14. Распределение ржаных хромосом в мейозе линии 3R(3B) в телофазе I (*а*) и телофазе II (*б*).

GISH: ДНК окрашена синим цветом, хромосомы ржи –– зеленым; центромерный район – красным. Масштабный отрезок 5 мкм.

тогенетических исследований микроспорогенеза у мутантов тетраплоидной и гексаплоидной пшениц, их анеуплоидных и делеционных линий показали, что на хромосоме пшеницы 3B также расположены гены, регулирующие формирование бивалентов независимо от 5B (Sears, 1954; Lee et al., 1970; Lelley, 1976; Miller et al., 1983; Darrier et al., 2022; Draeger et al., 2023). Так, в присутствии двух хромосом 5B нуллисомия по хромосоме 3B у гексаплоидной пшеницы приводит к снижению числа хиазм на стадии метафазы I (асинапсису) (Sears, 1954; Lee et al., 1970; Kato, Yamagata, 1982; Darrier et al., 2022), а делеция различных по длине фрагментов длинного плеча 3B уменьшает общее количество хиазм на 35 % (Darrier et al., 2022).

В нашей работе показано, что особенностью метафазы I у линии 3R(3B) являлось уменьшение числа хиазм в сравнении с сортом C29 – 34.9±0.62 и 41.92±0.38 соответственно. Гомологи хромосомы ржи 3R тоже формировали биваленты только в 86.82 % мейоцитов, из них в 21.36 % случаев биваленты были открытыми. Проведенный ранее анализ состава хромосом у растений линии 3R(3B) с помощью цитогенетических и молекулярных методов показал присутствие в кариотипе пары хромосом 5B (Silkova et al., 2006). Следовательно, наши результаты подтверждают полученные ранее данные о наличии генов на хромосоме 3B, регулирующих формирование хиазм независимо от генов на хромосоме 5B.

Недавно было получено подтверждение тому, что копии гена *ZIP4* в локусе *Ph1* хромосомы 5B (*TaZIP4-B2*) и на хромосомах 3A (*TaZIP4-A1*), 3B (*TaZIP4-B1*), 3D (*TaZIP4-D1*) не компенсируют отсутствие друг друга (Rey et al., 2017; Draeger et al., 2023). При отсутствии экспрессии *TaZIP4-B2* у этилметансульфонат индуцированных TILLING мутантов *Ph1* не происходит равнозначного увеличения экспрессии гомологов *ZIP4* на хромосомах 3-й гомеологичной группы (Rey et al., 2017). Цитогенетический анализ образования хиазм у TILLING мутантов по трем копиям генов *ZIP4* у тетраплоидной пшеницы показал, что *Ttzip4-A1* продуцирует фенотип, почти не отличающийся от нормальной пшеницы. Достоверное снижение числа хиазм на 10 % происходит у единичных мутантов *Ttzip4-B1* и *Ttzip4-B2*, а также у двойных мутантов *Ttzip4-A1B2* и *Ttzip4-B1B2*, но различия между ними несущественные, в среднем больше на один-два унивалента на клетку (Draeger et al., 2023). У двойных мутантов *Ttzip4-A1B1*, где *TtZIP4-B2* присутствует в единственной копии, кроссоверные обмены снижаются на 76–78 %, и растения становятся стерильными с высокой частотой (Draeger et al., 2023). Копии *TaZIP4* 3-й группы также преимущественно необходимы для гомологичных кроссоверов у гексаплоидной пшеницы (Martín et al., 2021).

На хромосоме 3B был идентифицирован набор генов, среди которых восемь (*CAP-E1/E2*, *DUO1*, *MLH1*, *MPK4*, *MUS81*, *RTEL1*, *SYN4*, *ZIP4*), как известно на сегодняшний день, участвуют в процессе рекомбинации (Darrier et al., 2022). Три копии генов, *CAP-E1/E2*, *MLH1* и *MPK4-3*, характеризовались самой высокой экспрессией, тогда как уровень экспрессии *ZIP4* был достоверно ниже и равным для гомеологов 3A, 3B и 3D. Исходя из этих данных *MPK4*, *CAP-E1/E2* и *MLH1* были выбраны как гены-кандидаты, ответственные за контроль образования хиазм (Darrier et al., 2022).

Отличительной особенностью метафазы I у линии 3R(3B) было также наличие мейоцитов с декомпактизованными хромосомами. Наиболее близкими по проявлению похожего мейотического фенотипа оказались двойные гетерозиготные мутанты арабидопсиса *AtCAP-E1+/–*, *AtCAP-E2–/–*, где ген *CAP-E1/E2* является функциональным ортологом гена *SMC2* (Structural Maintenance of Chromosomes 2), который принадлежит конденсиновому комплексу, участвующему в компактизации хромосом (Sutani et al., 1999). Анализ мутантов показал, что эти гены экспрессируются во время мейоза, а двойные гетерозиготные мутанты демонстрируют уменьшение конденсации хромосом в метафазе I и анафазе I (Siddiqui et al., 2003). По мнению авторов (Darrier et al., 2022), аномальное функционирование конденсинов как дополнительный фактор тоже может повлиять на нарушение формирования кроссоверных обменов.

Дополнительным доказательством наличия мейотических генов в хромосоме 3B стало картирование QTL десинапсиса *QTdes2.ndsu-3B* у растений твердой пшеницы с делецией длинного плеча хромосомы 3B, полученной с помощью радиационного облучения (Bassi et al., 2013). Однако последовательность нуклеотидов данной делеции не секвенирована, и нет возможности сопоставить ее с последовательностями уже известных генов.

Результаты нашей работы также демонстрируют отсутствие компенсационной способности хромосомы ржи 3R замещать хромосому 3B для нормального формирования кроссоверных обменов между гомологами. Асинапсис между гомологами при замещении хромосомы 3B гомеологами пшеницы или ржи показан ранее (Lee et al., 1970; Bassi et al., 2013). У замещенной линии 3D(3B) сорта Langdon твердой пшеницы на стадии метафазы I формируется до 14 унивалентов (Bassi et al., 2013). Замещение хромосомы пшеницы 3B хромосомой ржи 3R у линии мягкой пшеницы Харьковская-Даколд вызывает асинапсис между гомологами в 30 % мейоцитов (Lee et al., 1970). В другом случае добавление пары хромосом ржи 3R в кариотип пшенично-ржаных гибридов F_1 увеличивает число бивалентов в метафазе I (Lelley, 1976; Miller et al., 1983), а у дополненной линии Chinese Spring-Imperial по хромосоме 3R отмечено самое низкое уменьшение числа хиазм, на 1.1 % (Orellana et al., 1984).

Замещение хромосом 3R(3B) вызывает различные аномалии в мейотическом делении

Мейоз у растений линии 3R(3B) характеризовался комплексом аномалий в динамике МТ и поведении хромосом как в первом, так и во втором делениях. Эти результаты можно объяснить полученными ранее данными о совместной экспрессии гена *Ttzip4-B1* с ортологами мейотических генов (Alabdullah et al., 2019). При построении сети коэкспрессии ортологов известных мейотических генов пшеницы, связанных с *TaZIP4*, три гомеолога *TaZIP4* на хромосомах 3-й группы, 3A, 3B и 3D (*TraesCS3A02G401700*, *TraesCS3B02G434600* и *TraesCS3D02G396500*), кластеризовались в самом крупном модуле, относящемся к мейозу, и в значительной степени были связаны со многими ортологами мейотических генов с различными функциями: ассоциация сестринских кинетохор в первом делении мейоза, расхождение хромосом, формирование кроссоверных обменов классов I и II, защита когезинового комплекса в центромерном районе, контроль мейотического клеточного цикла, когезия сестринских хроматид, репарация двойных разрывов ДНК, синаптонемный комплекс, антикроссоверная активность, формирование двойных разрывов ДНК (Alabdullah et al., 2019). Однако копия *TaZIP4*, ответственная за фенотип *Ph1* (*TraesCS5B02G255100*), не кластеризовалась в этом модуле (Alabdullah et al., 2019), что еще раз подтверждает ее иной профиль экспрессии (Martín et al., 2018).

В нашей работе были выявлены аномалии в динамике МТ цитоскелета. Во время метафазы I у линии 3R(3B) происходило нарушение нуклеации МТ на кинетохорах отдельных бивалентов либо нарушение конвергенции МТ на полюсе, что могло вызвать отсутствие эквационной пластинки в 53.33 ± 14.62 % мейоцитов. Также обнаружено формирование цитоскелетом структуры наподобие арки при смещении ядра к оболочке клетки на стадии пахитены. Одной из причин этого может быть отсутствие гена *MPK4* (митоген-активируемая протеинкиназа), идентифицированного на хромосоме 3B (Darrier et al., 2022), который участвует в динамике МТ цитоскелета (Beck et al., 2010; Zeng et al., 2011).

Важной особенностью мейоза у линии 3R(3B) было асинхронное поведение хромосом во втором делении и наличие диад на стадии телофазы II. Такой мейотический фенотип соответствует мутантам по гену *TAM* (*tam 1* и *tam2*). *tam1* демонстрирует асинхронное деление в мейозе, а *tam2* – отсутствие второго деления и вызванную этим мейотическую реституцию. На хромосоме 3B был идентифицирован QTL *QTug.sau-3B*, отвечающий за формирование нередуцированных гамет у межвидовых гибридов (Hao et al., 2014). Оказалось, что *QTug.sau-3B* является синтенным локусу *TAM* у риса и *Brachypodium*, а у *Arabidopsis thaliana TAM* кодирует циклин CYCA1;2.

Нарушения в мейотическом делении у линии 3R(3B) могут быть вызваны не только отсутствием хромосомы пшеницы 3B. На сегодняшний день обнаружены изменения в экспрессии генов как у линий с замещениями хромосом пшеницы чужеродными хромосомами, так и у линий с дополненными чужеродными хромосомами (Rey et al., 2018; Dong et al., 2020). В линиях мягкой пшеницы с интрогрессией чужеродных хромосом возможно нарушение в поведении хромосом из-за формирования нового генетического фона, в котором происходит изменение экспрессии генов, как у реципиентов пшеницы, так и у доноров родственных видов (Rey et al., 2018; Dong et al., 2020). Так, у линии TA3575 с замещением хромосом 3B

хромосомами 3Sl#2 *Ae. longissima* выявлены гены с измененной экспрессией на всех хромосомах пшеницы (Dong et al., 2020). Согласно транскриптомному анализу, из 1839 генов, картированных на хромосоме 3B сорта Chinese Spring, 577 генов (31.43 %) изменили свою экспрессию. Большинство из них (461 ген, или 79.90 %) не транскрибировались, а 100 генов (17.33 %) имели пониженную экспрессию. Только 16 (2.77 %) генов имели повышенную экспрессию. Это указывает на то, что по крайней мере 34.57 % генов (461 из 1839) на отсутствующей хромосоме 3B не были генетически компенсированы интрогрессированной хромосомой 3Sl#2 *Ae. longissima* (Dong et al., 2020).

Заключение

Интрогрессия генетического материала родственных видов в виде хромосом и их фрагментов в геном мягкой пшеницы широко используется в селекции этой культуры для передачи генов, контролирующих важные агрономические признаки. Передача хромосом при вовлечении линий в гибридизацию зависит от поведения в мейозе как хромосом пшеницы, так и чужеродной хромосомы. В случае замещения хромосомы пшеницы, гены которой участвуют в регуляции мейотического деления, может быть выявлено наличие/отсутствие компенсационного эффекта у генов гомеологичных хромосом, принадлежащих родственным видам и родам. Ранее было показано, что на хромосоме пшеницы 3B расположены гены, регулирующие формирование бивалентов независимо от 5B, а также выявлена совместная экспрессия гена *Ttzip4-B1* с ортологами мейотических генов.

В нашей работе были изучены динамика МТ цитоскелета и поведение хромосом в мейозе у растений линии 3R(3B), где хромосома 3B замещена на хромосому ржи 3R. Эффект замещения 3R(3B) был проявлен не только в уменьшении числа хиазм в сравнении с сортом C29, 34.9 ± 0.62 и 41.92 ± 0.38 соответственно, но и в комплексе аномалий в динамике МТ и поведении хромосом как в первом, так и во втором делениях. Нарушения проявлялись в нуклеации МТ на кинетохорах, конвергенции МТ на полюсах деления веретена, формировании С-образного веретена, построении клеточной стенки, цитомиксисе, а также в асинхронности деления мейоцитов во втором делении и наличии диад на стадии телофазы II. Таким образом, результаты работы показали, что хромосома 3B сорта Саратовская 29 участвует в регуляции комплекса мейотических процессов, а у хромосомы ржи 3R отсутствует генетическая компенсационная способность замещать хромосому 3B для нормального прохождения мейоза.

Список литературы / References

Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы. *С.-х. биология.* 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409rus
[Kroupin P.Yu., Divashuk M.G., Karlov G.I. Gene resources of perennial wild cereals involved in breeding to improve wheat crop. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019; 54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409eng]

Юдина Р.С., Леонова И.Н., Салина Е.А., Хлесткина Е.К. Влияние чужеродных интрогрессий в геноме пшеницы на ее устойчивость к осмотическому стрессу. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014;18(4/1):643-649
[Yudina R.S., Leonova I.N., Salina E.A., Khlestkina E.K. Effect of alien genomic introgressions on the osmotic tolerance of wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014;18(4/1):643-649 (in Russian)]

Alabdullah A.K., Borrill P., Martin A.C., Ramirez-Gonzalez R.H., Hassani-Pak K., Uauy C., Shaw P., Moore G. A co-expression network in hexaploid wheat reveals mostly balanced expression and lack of significant gene loss of homeologous meiotic genes upon polyploidization. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1325. DOI 10.3389/fpls.2019.01325

Al-Kaff N., Knight E., Bertin I., Foote T., Hart N., Griffiths S., Moore G. Detailed dissection of the chromosomal region containing the *Ph1* locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling. *Ann. Bot.* 2008;101(6):863-872. DOI 10.1093/aob/mcm252

Appels R., Eversole K., Stein N., Feuillet C., Keller B., Rogers J., Pozniak C.J., Choulet F., Distelfeld A., Poland J., … Visendi P., Cui L., Du X., Feng K., Nie X., Tong W., Wang L. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science.* 2018;361(6403):eaar7191. DOI 10.1126/science.aar7191

Bariah I., Keidar-Friedman D., Kashkush K. Where the wild things are: transposable elements as drivers of structural and functional variations in the wheat genome. *Front. Plant Sci*. 2020;11:585515. DOI 10.3389/fpls.2020.585515

Bassi F.M., Kumar A., Zhang Q., Paux E., Huttner E., Kilian A., Dizon R., Feuillet C., Xu S.S., Kianian S.F. Radiation hybrid QTL mapping of *Tdes2* involved in the first meiotic division of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(8):1977-1990. DOI 10.1007/s00122-013-2111-z

Beck M., Komis G., Muller J., Menzel D., Samaj J. *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell.* 2010;22:755-771. DOI 10.1105/tpc.109.071746

Cook J.P., Wichman D.M., Martin J.M., Bruckner P.L., Talbert L.E. Identification of microsatellite markers associated with a stem solidness locus in wheat. *Crop Sci*. 2004;44(4):1397-1402. DOI 10.2135/cropsci2004.1397

Darrier B., Colas I., Rimbert H., Choulet F., Bazile J., Sortais A., Jenczewski E., Sourdille P. Location and identification on chromosome 3B of bread wheat of genes affecting chiasma number. *Plants*. 2022;11(17):2281. DOI 10.3390/plants11172281

Dong Z., Ma C., Tian X., Zhu C., Wang G., Lv Y., Friebe B., Li H., Liu W. Genome-wide impacts of alien chromatin introgression on wheat gene transcriptions. *Sci. Rep.* 2020;10(1):4801. DOI 10.1038/s41598-020-61888-1

Draeger T.N., Rey M.-D., Hayta S., Smedley M., Alabdullah A.K., Moore G., Martín A.C. *ZIP4* is required for normal progression of synapsis and for over 95 % of crossovers in wheat meiosis. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1189998. DOI 10.3389/fpls.2023.1189998

Giorgi B. A homoeologous pairing mutant isolated in *Triticum durum* cv. Cappelli. *Mutat. Breed. Newslett.* 1978;11:4-5

Griffiths S., Sharp R., Foote T.N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moore G. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*. 2006;439(7077):749-752. DOI 10.1038/nature04434

Hao M., Luo J., Zeng D., Zhang Li, Ning S., Yuan Z., Yan Z., Zhang H., Zheng Y., Feuillet C., Choulet F., Yen Y., Zhang L., Liu D. *QTug.sau-3B* is a major quantitative trait locus for wheat hexaploidization. *G3* (*Bethesda*). 2014;4(10):1943-1953. DOI 10.1534/g3.114.013078

Kato T., Yamagata H. Effect of 3B chromosome deficiency on the meiotic pairing between the arms of an isochromosome in common wheat. *Jpn. J. Genet.* 1982;57(4):403-406. DOI 10.1266/jjg.57.403

Lee Y.H., Larter E.N., Evans L.E. Meiotic behavior of wheat-rye addition and substitution lines. *Crop Sci.* 1970;10(2):144-145. DOI 10.2135/cropsci1970.0011183X001000020006x

Lelley T. Induction of homeologous pairing in wheat by genes of rye suppressing chromosome 5B effect. *Can. J. Genet. Cytol.* 1976;18(3):485-489. DOI 10.1139/g76-059

Ling H.Q., Ma B., Shi X., Liu H., Dong L., Sun H., Cao Y., Gao Q., Zheng Sh., Li Ye, Yu Y., Du H., Qi M., Li Y., Lu H., Yu H., Cui Y., Wang N., Chen Ch., Wu H., Zhao Y., Zhang J., Li Y., Zhou W., Zhang B., Hu W., van Eijk M.J.T., Tang J., Witsenboer H.M.A., Zhao Sh., Li Zh., Zhang A., Wang D., Lian Ch. Genome sequence of the progenitor of wheat A subgenome *Triticum urartu*. *Nature.* 2018;557(7705):424-428. DOI 10.1038/s41586-018-0108-0

Loginova D.B., Zhuravleva A.A., Silkova O.G. Random chromosome distribution in the first meiosis of F1 disomic substitution line 2R(2D) × rye hybrids (ABDR, 4x = 28) occurs without bipolar spindle assembly. *Comp. Cytogenet.* 2020;14(4):453-482. DOI 10.3897/compcytogen.v14.i4.55827

Martín A.C., Rey M.-D., Shaw P., Moore G. Dual effect of the wheat *Ph1* locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma*. 2017;126(6):669-680. DOI 10.1007/s00412-017-0630-0

Martín A.C., Borrill P., Higgins J., Alabdullah A., Ramírez-González R.H., Swarbreck D., Uauy C., Shaw P., Moore G. Genome-wide transcription during early wheat meiosis is independent of synapsis, ploidy level, and the *Ph1* locus. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1791. DOI 10.3389/fpls.2018.01791

Martín A.C., Alabdullah A.K., Moore G. A separation-of-function *ZIP4* wheat mutant allows crossover between related chromosomes and is meiotically stable. *Sci. Rep.* 2021;11(1):21811. DOI 10.1038/s41598-021-01379-z

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Yokohama, 2013

Mello-Sampayo T. Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nat. New Biol.* 1971;230(9):22-23. DOI 10.1038/newbio230022a0

Miller T.E., Reader S.M., Gale M.D. The effect of homoeologous group 3 chromosomes on chromosome pairing and crossability in *Triticum aestivum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 1983;25(6):634-641. DOI 10.1139/g83-094

Mohammed Y.S., Tahir I.S., Kamal N.M., Eltayeb A.E., Ali A.M., Tsujimoto H. Impact of wheat-*Leymus racemosus* added chromosomes on wheat adaptation and tolerance to heat stress. *Breed. Sci*. 2014;63(5):450-460. DOI 10.1270/jsbbs.63.450

Munkvold J.D., Greene R.A., Bermudez-Kandianis C.E., La Rota C.M., Edwards H., Sorrells S.F., Dake T., Benscher D., Kantety R., Linkiewicz A.M., … Kianian S.F., Sandhu D., Erayman M., Gill K.S., McGuire P.E., Qualset C.O., Sorrells M.E. Group 3 chromosome bin maps of wheat and their relationship to rice chromosome 1. *Genetics*. 2004;168(2):639-650. DOI 10.1534/genetics.104.034819

Orellana J., Cermeño M.C., Lacadena J.R. Meiotic pairing in wheat–rye addition and substitution lines. *Can. J. Genet. Cytol.* 1984;26(1):25-33. DOI 10.1139/g84-005

Paux E., Röger D., Badaeva E., Gay G., Bernard M., Sourdille P., Feuillet C. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant J*. 2006;48:463-474. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02891.x

Ramage R.T., Hernandez-Soriano J.M. Desynaptic genes in barley. *Barley Genet. Newslett.* 1972;2:65-68

Rey M.-D., Martín A.C., Higgins J., Swarbreck D., Uauy C., Shaw P., Moore G. Exploiting the *ZIP4* homologue within the wheat *Ph1* locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol. Breed.* 2017;37(8):95. DOI 10.1007/s11032-017-0700-2

Rey M.-D., Martín A.C., Smedley M., Hayta S., Harwood W., Shaw P., Moore G. Magnesium increases homoeologous crossover frequency during meiosis in *ZIP4* (*Ph1* gene) mutant wheat-wild relative hybrids. *Front. Plant Sci.* 2018;9:509. DOI 10.3389/fpls.2018.00509

Sears E.R. The Aneuploids of Common Wheat. Columbia MO, USA: Agric. Exp. Station, Univ. of Missouri, 1954

Sears E.R. Genetics Society of Canada award of excellence lecture an induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 1977;19(4):585-593. DOI 10.1139/g77-063

Siddiqui N.U., Stronghill P.E., Dengler R.E., Hasenkampf C.A., Riggs C.D. Mutations in *Arabidopsis* condensin genes disrupt embryogenesis, meristem organization and segregation of homologous chromosomes during meiosis. *Development*. 2003;130(14):3283-3295. DOI 10.1242/dev.00542

Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Adonina I.G., Kravtsova L.A., Roeder M.S., Salina E.A., Shchapova A.I., Shumny V.K. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. *Russ. J. Genet.* 2006;42(6):645-653. DOI 10.1134/S1022795406060093

Sutani T., Yuasa T., Tomonaga T., Dohmae N., Takio K., Yanagida M. Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev.* 1999;13(17):2271-2283. DOI 10.1101/gad.13.17.2271

Wada B., Kusunoki F. Spindle membrane in meiosis of pollen mother cells of *Tradescantia* and in mitosis of endosperm cells of *Zephyranthes*. *Cytologia* (*Tokyo*). 1964;29(1):109-117. DOI 10.1508/cytologia.29.109

Zeng Q., Chen J.-G., Ellis B.E. AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *Plant J*. 2011;67(5):895-906. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04642.x

Zhang P., Wanlong L., Fellers J., Friebe B., Gill B.S. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*. 2004;112(6):288-299. DOI 10.1007/s00412-004-0273-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.01.2024. После доработки 25.03.2024. Принята к публикации 26.03.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):377-386

DOI 10.18699/vjgb-24-43

Молекулярно-цитогенетическая характеристика новых интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине

О.А. Баранова [1], И.Г. Адонина [2], С.Н. Сибикеев [3]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

baranova_oa@mail.ru

Аннотация. Опережающая селекция пшеницы на устойчивость к патогенам – залог предотвращения экономически значимых потерь урожая от болезней. В последние годы в основных зернопроизводящих областях Российской Федерации наблюдается увеличение вредоносности опасного заболевания пшеницы – стеблевой ржавчины (возбудитель *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). В то же время сохраняется опасность заноса на территорию России расы патогена Ug99 (TTKSK), которая угрожает производству зерна во всем мире. В связи с этим большое значение приобретают перенос эффективных генов резистентности от родственных видов в селекционный материал мягкой пшеницы, выявление хромосомной локализации интрогрессий и проведение маркерного анализа для идентификации известных генов устойчивости. В настоящей работе был проведен комплексный анализ десяти интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции Федерального аграрного научного центра Юго-Востока (Л657, Л664, Л758, Л935, Л960, Л968, Л971, Л995/1, Л997 и Л1110), полученных с участием *Triticum dicoccum*, *T. timopheevii*, *T. kiharae*, *Aegilops speltoides*, *Agropyron elongatum* и *Secale cereale*. Оценка интрогрессивных линий в полевых условиях на устойчивость к расе Ug99 (TTKSK) показала, что четыре линии были иммунны, две – устойчивы, три – среднеустойчивы, а одна имела промежуточный тип реакции на заражение. Цитогенетический анализ с помощью методов флуоресцентной (FISH) и геномной (GISH) гибридизации *in situ* выявил интрогрессии от *Ae. speltoides* (линия Л664), *T. timopheevii* (линии Л758, Л971, Л995/1, Л997 и Л1110), *Thinopyrum ponticum* = *Ag. elongatum* (2*n* = 70) (Л664, Л758, Л960, Л971, Л997 и Л1110), а также интрогрессии от *T. dicoccum* (Л657 и Л664), *T. kiharae* (Л960) и *S. cereale* (Л935 и Л968). Для идентификации известных генов устойчивости (*Sr2*, *Sr25*, *Sr32*, *Sr1A.1R*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39* и *Sr47*) использовали молекулярные маркеры, рекомендованные для маркер-ориентированной селекции. Наличие генов *Sr36* и *Sr25* было постулировано у двух линий (Л997 и Л1110), генов *Sr39*, *Sr25* и *Sr47* – у линии Л664. У линий Л935 и Л968 с замещением 3D(3R) от *S. cereale* ген устойчивости к стеблевой ржавчине предположительно определен как *SrSatu*. Высокоустойчивые как к местным популяциям *P. graminis*, так и к расе Ug99 линии мягкой пшеницы являются перспективными донорами для создания новых устойчивых к стеблевой ржавчине сортов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L.; интрогрессивные линии пшеницы; чужеродные интрогрессии; *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; Ug99; *Sr* гены.

Для цитирования: Баранова О.А., Адонина И.Г., Сибикеев С.Н. Молекулярно-цитогенетическая характеристика новых интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):377-386. DOI 10.18699/vjgb-24-43

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-26-00172 «Биологическое обоснование генетической защиты пшеницы от стеблевой ржавчины на территории Поволжья». Цитологический анализ выполнен в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

Благодарности. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Molecular cytogenetic characteristics of new spring bread wheat introgressive lines resistant to stem rust

O.A. Baranova [1], I.G. Adonina [2], S.N. Sibikeev [3]

[1] All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg-Pushkin, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[3] Federal Center of Agricultural Research of the South-East Region, Saratov, Russia

baranova_oa@mail.ru

Abstract. Anticipatory wheat breeding for pathogen resistance is key to preventing economically significant crop losses caused by diseases. Recently, the harmfulness of a dangerous wheat disease, stem rust, caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, was increased in the main grain-producing regions of the Russian Federation. At the same time, importation

© Баранова О.А., Адонина И.Г., Сибикеев С.Н., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

of the Ug99 race (TTKSK) is still a possibility. In this regard, the transfer of effective resistance genes from related species to the bread wheat breeding material followed by the chromosomal localization of the introgressions and a marker analysis to identify known resistance genes is of great importance. In this work, a comprehensive analysis of ten spring bread wheat introgressive lines of the Federal Center of Agricultural Research of the South-East Region (L657, L664, L758, L935, L960, L968, L971, L995/1, L997 and L1110) was carried out. These lines were obtained with the participation of *Triticum dicoccum*, *T. timopheevii*, *T. kiharae*, *Aegilops speltoides*, *Agropyron elongatum* and *Secale cereale*. In this study, the lines were evaluated for resistance to the Ug99 race (TTKSK) in the Njoro, Kenya. Evaluation of introgression lines in the field for resistance to the Ug99 race (TTKSK) showed that four lines were immune, two were resistant, three were moderately resistant, and one had an intermediate type of response to infection. By cytogenetic analysis of these lines using fluorescent (FISH) and genomic (GISH) *in situ* hybridization, introgressions from *Ae. speltoides* (line L664), *T. timopheevii* (lines L758, L971, L995/1, L997 and L1110), *Thinopyrum ponticum* = *Ag. elongatum* (2*n* = 70) (L664, L758, L960, L971, L997 and L1110), as well as introgressions from *T. dicoccum* (L657 and L664), *T. kiharae* (L960) and *S. cereale* (L935 and L968) were detected. Molecular markers recommended for marker-oriented breeding were used to identify known resistance genes (*Sr2*, *Sr25*, *Sr32*, *Sr1A.1R*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39* and *Sr47*). The *Sr36* and *Sr25* genes were observed in lines L997 and L1110, while line L664 had the *Sr39*+*Sr47*+*Sr25* gene combination. In lines L935 and L968 with 3R(3D) substitution from *S. cereale*, gene resistance was presumably identified as *SrSatu*. Thus, highly resistant to both local populations of *P. graminis* and the Ug99 race, bread wheat lines are promising donors for the production of new varieties resistant to stem rust.

Key words: *Triticum aestivum* L.; introgressive wheat lines; alien introgressions; *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; Ug99; *Sr* genes.

For citation: Baranova O.A., Adonina I.G., Sibikeev S.N. Molecular cytogenetic characteristics of new spring bread wheat introgressive lines resistant to stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):377-386. DOI 10.18699/vjgb-24-43

Введение

Одним из условий повышения урожайности мягкой пшеницы является создание сортов, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам. В набор наиболее вредоносных биострессоров для мягкой пшеницы входит группа возбудителей ржавчинных заболеваний: *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* Erikss., *P. striiformis* f. sp. *tritici* Erikss., *P. graminis* f. sp. *tritici* Erikss. & Henning. Эти возбудители вызывают эпифитотии бурой, желтой и стеблевой ржавчины. Вредоносность каждой их них может достигать 50 % (Knott, 1989). Возбудители данных заболеваний характеризуются высокой вирулентностью и большим разнообразием по расовому составу (Gultyaeva et al., 2021, 2022; Baranova et al., 2023).

В мировом производстве мягкой пшеницы и в условиях России отдельное место занимает стеблевая ржавчина (возбудитель *P. graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*)), способная вызвать потери урожая выше 80 % при эпифитотийном развитии на восприимчивых сортах. Широко известная раса возбудителя стеблевой ржавчины Ug99 (TTKSK) и ее разновидности, поражающие сорта и линии пшеницы с эффективными генами устойчивости *Sr31*, *Sr36* и *Sr24*, до сих пор представляют реальную угрозу производству пшеницы в регионах Африканского континента, странах Ближнего Востока и Азии. В связи с возможностью распространения спор гриба с воздушными массами на огромные расстояния остается угроза заноса патогена на территорию стран Евразии, в том числе в Россию. За последнее десятилетие в Европе, Казахстане, Китае и Российской Федерации появились агрессивные расы гриба, не относящиеся к разновидностям Ug99, но вызвавшие сильнейшие вспышки заболевания (Василова и др., 2017; Lewis et al., 2018; Баранова и др., 2021; Patpour et al., 2022).

Низкое разнообразие по генам устойчивости к стеблевой ржавчине является общей проблемой коммерческих сортов пшеницы во всем мире. В отечественных сортах используется ген возрастной устойчивости *Sr57* (*Lr34/Yr18/Pm38/Bdv1*), входящий в локус с плейотропным действием, детерминирующий неспецифическую устойчивость к биотрофным патогенам, а также гены ювенильной устойчивости, такие как *Sr38*, *Sr6Agi*, *Sr25* и *Sr31*. Ген *Sr31* пока сохраняет эффективность против стеблевой ржавчины на территории Российской Федерации (Baranova et al., 2023). *Sr6Agi* и *Sr25* теряют эффективность на территории Поволжья, но эффективны против западносибирских популяций гриба (Кельбин и др., 2020; Баранова и др., 2021). Ген *Sr38* неэффективен против поволжских популяций патогена, но рекомендуется для селекции в условиях Западной Сибири (Сколотнева и др., 2021).

Для расширения генетической основы сортов чрезвычайно актуально получить селекционный материал, разнообразный по генам устойчивости. В целом эта проблема решается с привлечением родственных видов мягкой пшеницы, в основном из вторичного и третичного генпулов. В настоящее время из 63 генов устойчивости к стеблевой ржавчине 26 перенесены из геномов родственных видов (McIntosh et al., 2013, 2022). Для практической селекции мягкой пшеницы виды *Ae. speltoides*, *T. timopheevii*, *T. dicoccum*, *T. ponticum*, *S. cereale* остаются важными источниками ценных генов устойчивости к грибным болезням, и в частности к стеблевой ржавчине (McIntosh et al., 2013). От *Aegilops speltoides* (Taush) (SS, 2*n* = 14) в геном пшеницы перенесены гены *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*, от *Triticum timopheevii* Zhuk. (A^tA^tGG, 2*n* = 28) – *Sr36*, *Sr37*, *Sr40*, от *Secale cereale* L. (RR, 2*n* = 14) – *Sr31*, *Sr27*, *Sr1A.1R*, *Sr50* (McIntosh et al., 2013). Важными моментами использования этих генов для создания устойчивых сортов мягкой пшеницы являются их эффективность против *P. graminis*, а также характер и размер интрогрессированного материала. Актуально создание комбинаций из эффективных на данный момент *Sr* генов между собой или с генами, частично потерявшими свою эффективность, либо с генами возрастной устойчивости.

В Федеральном аграрном научном центре Юго-Востока (ФАНЦ Юго-Востока) ведется работа по созданию нового селекционного материала с привлечением сородичей

Таблица 1. Родословная интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы

Номер линии	Родословная	Источник чужеродного генетического материала
Л657	Л505*2//Л503/3/Л528//АД *T.dic/Ae.spelt**5С29/4/Thatcher *Lr*28	*Triticum dicoccum* Shuebl (BA), *Aegilops speltoides* Tausch (S)
Л664	С55//Добр/Л164//Agr139/Л528*2//АД *T.dic/Ae.spelt**5С29//Добр	*T. dicoccum* Shuebl (BA), *Ae. speltoides* Tausch (S), *Agropyron elongatum* (Host) Beauv. (источник – сорт Добрыня как носитель транслокации 7DS-7DL-7Ae#1L)
Л758	Л XI С29 им/Л2870	*T. timopheevii*, *Ae. tauschii* (источник – иммунные линии сорта Саратовская 29 (С29 им))
Л935	Satu/C70//C70	*Secale cereale* L. (R) (источник – сорт тритикале Satu)
Л960	С68/*T.kiharae*//С70/3/С68	*T. kiharae* Dorof. et Migusch ((GA^{t}D)
Л968	Satu/C70//C74/3/C70/4/C70	*S. cereale* L. (R), сорт тритикале Satu
Л971	С68/*T.timopheevii**4//Добр	*T. timopheevii* Zhuk. (GA^t), *Ag. elongatum* (Host) Beauv. (источник – сорт Добрыня, транслокация 7DS-7DL-7Ae#1L)
Л995/1	С70/Памяти Майстренко//С68	*T. timopheevii* и *Ae. tauschii* (источник – сорт Памяти Майстренко)
Л997	С70/Памяти Майстренко//Добрыня	*T. timopheevii* и *Ae. tauschii* (источник – сорт Памяти Майстренко); *Ag. elongatum* (Host) Beauv. – источник транслокации 7DS-7DL-7Ae#1L сорт Добрыня
Л1110	Л VI С29 им/Л2032//Л2032/3/Л2032	*T. timopheevii*, *Ae. tauschii* (источник – иммунные линии сорта Саратовская 29 (С29 им)); *Ag. elongatum* (Host) Beauv. – транслокация Л2032 7DS-7DL-7Ae#1L от *Ag. elongatum* (Host) Beauv.

Примечание. В родословных линий указаны сорта яровой мягкой пшеницы Л503, Л505, Добрыня (Добр), Саратовская 29 (С29), Саратовская 55 (С55), Саратовская 68 (С68), Саратовская 70 (С70), Саратовская 74 (С74), а также линии яровой мягкой пшеницы Л164, Л528, Л2870, Л2032, Agr139, Л VI С29 им, Л XI С29 им.

мягкой пшеницы. Ранее линии, созданные с участием широкого набора видов, показали высокую устойчивость к бурой ржавчине в условиях саратовского Поволжья (Гультяева и др., 2020). Цель нашей работы – комплексное изучение новых интрогрессивных линий, включающее в себя оценку устойчивости к расе стеблевой ржавчины Ug99 (TTKSK), хромосомную локализацию чужеродных интрогрессий и идентификацию генов *Sr* с использованием молекулярных маркеров.

Материалы и методы

Растительный материал. Изучено десять интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы ФАНЦ Юго-Востока. Их родословная с указанием донора чужеродного генетического материала приведена в табл. 1.

Цитогенетический анализ. Препараты митотических хромосом готовили из меристемы корней проростков в соответствии с методикой (Badaeva et al., 2017). Для анализа кариотипа линий применяли метод FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация) с использованием зондов на основе различных повторяющихся последовательностей: Spelt1 (Салина и др., 1997) и Spelt52 (Salina et al., 2004), pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) и apAs1 (Rayburn, Gill, 1986). Для FISH применяли методику, описанную в работе (Salina et al., 2006), с незначительными модификациями. GISH (геномная *in situ* гибридизация) с использованием меченой геномной ДНК *S. cereale* в качестве зонда проводили в соответствии с ранее опубликованной работой (Schubert et al., 1998). Препараты анализировали с помощью микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой ProgRes MF CCD и программным обеспечением Isis (Meta Systems, Германия).

Фитопатологический анализ. Анализ на устойчивость к расе Ug99 (TTKSK) проводился на стадии взрослых растений по модифицированной шкале Кобба (Peterson et al., 1948) в 2023 г. в фитопатологических питомниках на базе International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) в Кенийском научно-исследовательском учреждении в области сельского хозяйства и животноводства (KALRO) в Нжоро (Njoro). Основным отличительным признаком патотипов расы Ug99 является вирулентность к носителям гена *Sr31*. Степень поражения сортов с геном *Sr31* в фитопатологических питомниках KALRO в вегетационный сезон 2023 г. составила: для сорта Прохоровка (*Sr31*) – 60 % (60MSS), сорта Юго-Восточная 2 (*Sr31*) – 80 % (80S), сорта Саратовская 74 (без *Sr* генов) – 80 % (80S).

Молекулярно-генетический анализ. ДНК выделяли из пятидневных проростков пшеницы с использованием цетилтриметиламмония бромида (CTAB метод) (Murray, Thompson, 1980). Для идентификации генов устойчивости *Sr2*, *Sr32*, *Sr1A.1R*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr47* применяли ДНК-маркеры, рекомендованные для маркер-ориентированной селекции (MAS). Список использованных в работе молекулярных маркеров со ссылками на источники представлен в Приложении 1[1]. ПЦР проводили в двух повторностях на термоциклерах C1000 Thermal Cycler (производство BioRad). Продукты амплификации разделяли в 2 % агарозных и 8 % полиакриламидных гелях, окрашенных бромистым этидием. Положительным контролем служили изогенные линии и сорта с известными генами *Sr*, негативным – восприимчивый сорт Хакасская. Для контроля на контаминацию брали ПЦР смесь без добавления ДНК. В качестве маркера молекулярного веса применяли GeneRulerTM 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли с помощью гельдокументирующей системы ChemiDoc™ (Bio-Rad).

[1] Приложения 1–5 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx14.pdf

Результаты

Фитопатологический анализ интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы

Фитопатологический скрининг линий на стадии взрослых растений показал, что все линии в разной степени были устойчивы к расе Ug99: четыре линии были иммунны (тип реакции 0), две – устойчивы (R), три – среднеустойчивы (MR) к этой высокоагрессивной расе гриба (табл. 2). Исключение составляла только одна линия – Л995/1, которая при развитии болезни 5 % имела промежуточный тип реакции (M).

Цитогенетический анализ интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы

Целью цитогенетического анализа интрогрессивных линий было выявление чужеродного генетического материала и определение его состояния в реконструированном геноме мягкой пшеницы – в виде дополненных или замещенных хромосом и транслокаций.

Основные результаты цитогенетического анализа представлены в табл. 2 и на рисунке. Дополнительная информация с указанием использованных комбинаций зондов приведена в Приложении 2.

Кариотипирование линий показало, что каждая из них характеризуется стандартным для гексаплоидной пшеницы числом хромосом – 42. Для каждой из десяти линий была проведена FISH с зондами pSc119.2 и pAs1. Зонд pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) преимущественно локализуется на хромосомах генома B мягкой пшеницы, а pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) – на хромосомах генома D. Одновременное использование этих зондов позволяет идентифицировать все хромосомы геномов B и D и некоторые хромосомы генома A (Schneider et al., 2003). Кроме того, по локализации сигналов гибридизации с зондом pSc119.2 можно идентифицировать хромосомы генома G *T. timopheevii* (Jiang, Gill, 1994). Для анализа двух линий, у которых в родословной присутствовала рожь, применялась GISH с ДНК *S. cereale*. Анализ восьми линий, у которых в родословных были представлены *Ae. speltoides*, *T. timopheevii* или *T. kiharae*, включал в себя гибридизацию с зондами Spelt1 и Spelt52 (выполнение GISH с ДНК этих видов затруднено из-за их близкого родства с мягкой пшеницей).

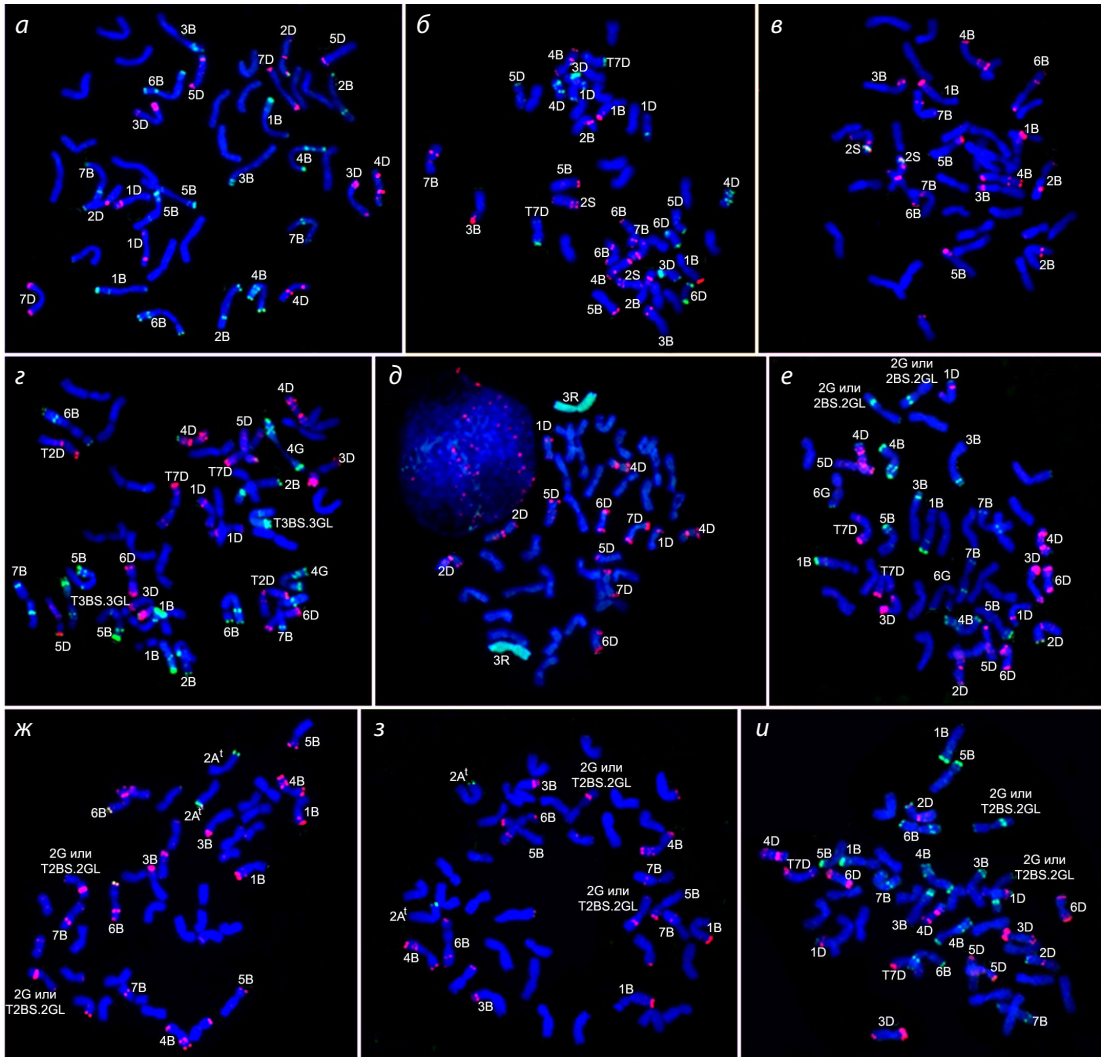
Линии Л657 и Л664 были получены с участием *Ae. speltoides*. У линии Л657 сайты повтора Spelt52 не выявлены, а зонд Spelt1 локализуется на концах плеч хромосомы 6B. По данным предыдущих исследований, такая локализа-

Таблица 2. Характеристика интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы по транслокациям/замещениям, *Sr* генам и устойчивости к стеблевой ржавчине (Ug99) на стадии взрослых растений

Линия	Результат цитогенетического исследования	Идентифицированные *Sr* гены*	Устойчивость к *P. graminis* f. sp. *tritici* раса Ug99 (TTKSK)**
Л657	6A$^{T.\ dicoccum}$(6D)	–	5RMR
Л664	2A$^{T.\ dicoccum}$(2A) или T2AS.2A$^{T.\ dicoccum}$L 2S(2D) – от *Ae. speltoides* Транслокация от *Th. ponticum* в 7DL	*Sr25*, *Sr39*, *Sr47*	5RMR
Л758	T2A^{t}.2A – от *T. timopheevii* Транслокация от *Th. ponticum* в 7DL	*Sr25*	5R
Л935	3R(3D) – от *S. cereale*	–	0
Л960	2A^{t}(2A) – от *T. kiharae* T3BS.3GL – от *T. kiharae* 4G(4B) – от *T. kiharae* T2D$^{(T.\ aestivum)}$S.2D$^{(T.\ kiharae)}$L Транслокация от *Th. ponticum* в 7DL	*Sr25*	5MR
Л968	3R(3D) – от *S. cereale*	–	0
Л971	2A^{t}(2A) – от *T. timopheevii* 2G(2B) или T2BS.2GL – от *T. timopheevii* 6G(6B) – от *T. timopheevii* Транслокация от *Th. ponticum* в 7DL	*Sr25*	5R
Л995/1	2A^{t}.2A – от *T. timopheevii* 2G(2B) или T2BS.2GL – от *T. timopheevii*	–	5M
Л997	2A^{t}.2A – от *T. timopheevii* 2G(2B) или T2BS.2GL – от *T. timopheevii* Транслокация от *Th. ponticum* в 7DL	*Sr25*, *Sr36*	0
Л1110	2A^{t}.2A – от *T. timopheevii* 2G(2B) или T2BS.2GL – от *T. timopheevii* Транслокация от *Th. ponticum* в 7DL	*Sr25*, *Sr36*	0

* Представлены гены, идентификация которых подтверждена цитогенетически и анализом родословных; ген *Sr25* идентифицирован ранее (Баранова и др., 2023).

** Устойчивость: 0 – иммунный тип, R – устойчивый, MR – среднеустойчивый, RMR – промежуточный тип реакции между устойчивостью и средней устойчивостью, M – промежуточный тип реакции между средней устойчивостью и средней восприимчивостью.



Результаты FISH и GISH с разными комбинациями зондов на метафазных хромосомах интрогрессивных линий мягкой пшеницы.

Зонды pSc119.2 (зеленый), pAs1 (красный): *а* – линия Л657, *б* – Л664, *г* – Л960, *е* – Л971, *и* – Л1110; зонды Spelt52 (зеленый), pSc119.2 (красный): *в* – Л664, *з* – Л997; зонды Spelt1 (зеленый), pSc119.2 (красный): *ж* – Л997; ДНК ржи (зеленый), pAs1(красный): *д* – линия Л968.

ция Spelt1 встречается у сортов мягкой пшеницы (Salina et al., 2006). Следовательно, с уверенностью говорить о транслокациях от *Ae. speltoides* у этой линии мы не можем. FISH с зондом pAs1 показала отсутствие у линии Л664 хромосом 2D и выявила пару хромосом со слабым сигналом pSc119.2 на коротком плече и двумя сигналами на длинном плече (см. рисунок, *б*), на котором также присутствует сайт Spelt52 (см. рисунок, *в*). Данная хромосома была определена нами как хромосома 2S *Ae. speltoides* (Badaeva et al., 1996; Ruban, Badaeva, 2018). Таким образом, в случае линии Л664 нами установлено хромосомное замещение 2S(2D). Кроме этого, результаты гибридизации зондов pSc119.2 и pAs1 на хромосомах линии Л657 (см. рисунок, *а*) указывают на замещение хромосомы 6D предположительно на хромосому 6A *T. dicoccum*, вида, который присутствует в родословной этой линии. У линии Л664 сайты Spelt1 выявлены на концах длинных плеч пары хромосом генома А, наиболее вероятно, хромосом 2А. У сортов мягкой пшеницы такая локализация этого зонда не отмечена, но она характерна для тетраплоидных пшениц, в частности для *T. dicoccum*, и может свидетельствовать о хромосомном замещении или транслокации от данного вида (присутствующего в родословной).

У линий Л758, Л960, Л971, Л995/1, Л997 и Л1110 ожидалось наличие интрогрессий от видов *T. timopheevii* или *T. kiharae.* Интересно, что во всех шести линиях слабые сигналы гибридизации с зондом Spelt52 выявлены на коротких плечах пары хромосом генома А, скорее всего, хромосом 2А (см. рисунок, *з*). Такая локализация Spelt52 характерна для *T. timopheevii* или *T. kiharae* и может указывать на транслокации от этих видов. Сигналы гибридизации с зондом Spelt1 у линии Л758 не выявлены. Линии Л995/1, Л997 и Л1110 несут блоки Spelt1 на концах коротких плеч хромосом 6В (см. рисунок, *ж*), что характерно для ряда сортов мягкой пшеницы (Salina et al., 2006). Локализация Spelt1 на длинных плечах хромосом 2А у линий Л960, Л971, Л997 и Л1110 (см. рисунок, *ж*) в сочетании с локализацией зонда Spelt52 на коротких плечах

этих хромосом (см. рисунок, *з*) может свидетельствовать о замещении хромосомы 2A на $2A^t$ (от *T. timopheevii* или *T. kiharae* соответственно) у этих линий. У Л960 еще один сайт Spelt1 расположен на длинном плече хромосомы, которая по локализации зонда pSc119.2 соответствует хромосоме 4G *T. timopheevii*, хромосома 4B при этом отсутствует (см. рисунок, *г*). Полученные результаты свидетельствуют о том, что линия Л960 имеет хромосомное замещение 4G(4B). Также по локализации зонда pSc119.2 у линии Л960 можно предположить транслокацию T3BS.3GL. Распределение зонда pAs1 на длинном плече хромосомы 2D у данной линии практически идентично таковому у *T. kiharae*, что говорит о вероятной транслокации $T2D^{(T.\ aestivum)}S.2D^{(T.\ kiharae)}L$ (см. рисунок, *г*). Следует отметить, что у Л960, а также у линий Л758, Л664, Л971, Л997 и Л1110 локализация зонда pAs1 на длинном плече хромосомы 7D не соответствует мягкой пшенице, что указывает на транслокацию (см. рисунок, *б*, *е*, *и*). Наличие у четырех из этих линий гена *Sr25* (Баранова и др., 2023), перенесенного в геном мягкой пшеницы от *Th. ponticum* (Friebe et al., 1996), и картина гибридизации pAs1 на длинном плече хромосомы J^s-7 пырея (Cui et al., 2018) позволяют заключить, что хромосомы 7D этих линий несут транслокации от *Th. ponticum*.

В случае линий Л995/1, Л971 и Л997, Л1110 по результатам гибридизации с зондом pSc119.2 можно говорить о замещении хромосомы 2B на 2G *T. timopheevii*, 2G(2B), или о транслокации T2BS.2GL (см. рисунок, *е–и*). Дополнительно у линии Л971 предполагается хромосомное замещение 6G(6B) (см. рисунок, *е*).

Линии Л935 и Л968 были получены с участием австралийского сорта тритикале Satu. GISH с ДНК ржи и FISH с зондами pSc119.2 + pAs1 показали у этих линий замещение хромосом 3D на пару хромосом 3R (см. рисунок, *д*).

Идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине с использованием молекулярных маркеров

Результаты идентификации генов *Sr* у анализируемых линий с помощью молекулярных маркеров, подтвержденные анализом родословных и данными цитогенетического анализа, представлены в табл. 2. В настоящей работе у разных линий были обнаружены фрагменты ПЦР, специфичные для генов *Sr32*, *Sr39*, *Sr47* (*Ae. speltoides*), *Sr36* (*T. timopheevii*) и *Sr38* (*Ae. ventricosa*). Все полученные результаты ПЦР анализа с указанием использованных молекулярных маркеров приведены в Приложении 3. Диагностический фрагмент маркера VENTRIUP-LN2 для гена *Sr38* наблюдали только у линии Л971 (см. Приложение 3). Присутствие гена *Sr36* было установлено у двух линий, Л997 и Л1110, с использованием маркера *Xstm773-2* (см. табл. 2, Приложение 3).

Ген *Sr39* идентифицировали с использованием маркера Sr39#22. Диагностический фрагмент (800 п. о.) был обнаружен у пяти линий (Приложение 4, см. Приложение 3). Для выявления гена *Sr32* применяли маркер csSr32#2. Диагностический фрагмент наблюдали у трех линий – Л960, Л968 и Л995/1. Ген *Sr47* идентифицировали с использованием трех маркеров – *Xgwm501*, *Xgpw4043* и *Xgwm47* (Приложение 3 и 5). Диагностический фрагмент маркера *Xgwm501* (109 п. о.) был выявлен у четырех линий – Л971, Л995/1, Л997 и Л1110. Из двух диагностических фрагментов маркера *Xgpw4043* только фрагмент длиной 95 п. о. амплифицировался у линий Л657, Л664, Л758 и Л971, фрагмент 115 п. о. отсутствовал (см. Приложение 5). Диагностический фрагмент маркера *Xgwm47* (165 п. о.) был идентифицирован только у линии Л664.

Ранее все анализируемые нами линии были протестированы на присутствие гена *Sr25* (Баранова и др., 2023) с использованием рекомендованного для маркер-ориентированной селекции маркера *Gb* (Prins et al., 2001). Данный ген выявлен у шести линий (см. табл. 2, Приложение 3). По результатам предыдущих исследований (Баранова и др., 2023) и настоящей работы гены *Sr2*, *Sr24*, *Sr28*, *Sr31*, *Sr1A.1R* и *Sr57* не обнаружены ни у одной из линий.

Обсуждение

Эффективность молекулярных маркеров, рекомендованных для маркер-ориентированной селекции для выявления генов устойчивости к стеблевой ржавчине

Молекулярные маркеры широко используются для идентификации генов устойчивости к различным патогенам, в том числе к стеблевой ржавчине. Среди огромного количества молекулярных маркеров выделены наиболее специфичные, рекомендованные для маркер-ориентированной селекции (https://maswheat.ucdavis.edu/). Однако работая с разнообразным растительным материалом, особенно с интрогрессивными линиями, исследователь может столкнуться с недостаточной специфичностью даже рекомендованного маркера и, как следствие, с ложноположительной идентификацией гена. В связи с этим желательно проводить исследования в комплексе и подтверждать наличие искомого гена наряду с данными молекулярно-генетического анализа изучением родословных, цитогенетическими и фитопатологическими результатами.

В ходе нашей работы интрогрессивные линии были проанализированы цитогенетически и с использованием молекулярных маркеров. Также учитывали данные родословных линий.

У шести из десяти исследованных линий (Л664, Л758, Л960, Л971, Л997 и Л1110) ранее был идентифицирован ген *Sr25* (Баранова и др., 2023), что полностью подтвердилось данными цитогенетического анализа в настоящей работе (см. табл. 2). Ген *Sr25* сцеплен с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr19* и локализован в транслокации T7DS·7DL-7Ae#1L от *Th. ponticum* (Friebe et al., 1994).

Результаты идентификации гена *Sr36* с использованием маркера *Xstm773-2* тоже подтверждаются цитогенетическим анализом. Как известно, ген *Sr36* локализуется в хромосоме 2G (Friebe et al., 1996). Линии Л997 и Л1110, у которых по данным молекулярно-генетического анализа был выявлен этот ген, несут хромосому 2G от *T. timopheevii* (см. рисунок, *ж–и*, табл. 2).

Неоднозначные результаты получены нами относительно генов устойчивости *Sr32*, *Sr39* и *Sr47*, источником которых является *Ae. speltoides*. Цитогенетический анализ выявил генетический материал от *Ae. speltoides* (замещение хромосомы 2D на хромосому 2S – 2S(2D) только у

линии Л664, в родословной которой присутствует этот вид). Однако диагностический фрагмент маркера Sr39#22 (маркер гена *Sr39*) был идентифицирован также у линий Л971, Л995/1, Л997 и Л1110 (см. Приложение 3), в родословных которых отсутствует *Ae. speltoides*, но есть генетический материал от *T. timopheevii*, что подтвердилось цитогенетически. Также, исходя из родословных Л997 и Л1110, в скрещиваниях использовали синтетик доктора Савова (GA^{t}D) (*T. timopheevii* × *T. tauschii*). Таким образом, диагностический фрагмент маркера Sr39#22 амплифицировался у линий с материалом *T. timopheevii* и, возможно, *T. tauschii.* Надо отметить, что аналогичные результаты по маркеру Sr39#22 были получены Е.И. Гультяевой с коллегами (Гультяева и др., 2014). В их исследовании отмечено, что, несмотря на то, что данный маркер широко используется для идентификации гена *Sr39/Lr35*, его диагностический фрагмент амплифицировался в образцах пшеницы с материалом *T. timopheevii* и *T. tauschii* – например, в сорте Памяти Майстренко, который применялся для получения линий Л995/1 и Л997 (см. табл. 1).

Диагностический фрагмент маркера csSr32#2 (152 п. о.) гена *Sr32* был идентифицирован у линий Л960, Л968 и Л995/1 с генетическим материалом *T. kiharae* и *Th. ponticum* (линия Л960), *S. cereale* L. (линия Л968) и *T. timopheevii* (линия Л995/1) (см. Приложение 3). Исходя из вышеотмеченного, мы не стали учитывать полученные результаты по данному маркеру гена *Sr32*, считая их ярким примером ложноположительной идентификации гена.

Еще один ген от *Ae. speltoides* – *Sr47* – мы идентифицировали с использованием трех маркеров, *Xgwm501*, *Xgwm47* и *Xgpw4043*, результаты по которым тоже неоднозначны. Диагностический фрагмент (109 п. о.) маркера *Xgwm501* четко выявлялся у линий Л971, Л995/1, Л997 и Л1110 (см. Приложение 3), которые описывались выше и в родословных которых присутствуют сорт Памяти Майстренко и синтетик доктора Савова (GA^{t}D) – *T. timopheevii* × *T. tauschii.* Генетического материала от *Ae. speltoides* в них нет, что видно и из цитогенетического анализа (см. табл. 2). Что касается маркера *Xgpw4043*, то диагностический фрагмент 95 п. о. наблюдался у линий Л657, Л664, Л758 и Л971, второй диагностический фрагмент 115 п. о. отсутствовал. Такая ситуация описана в работе (Klindworth et al., 2012), когда у части линий пшеницы с геном *Sr47* фрагмент 115 п. о. не амплифицировался или отличался по интенсивности окрашивания, а амплифицировался только фрагмент 95 п. о., и авторы настоятельно рекомендовали для идентификации *Sr47* подбирать несколько маркеров. Только у линии Л664, в родословной которой есть *Ae. speltoides* и цитогенетическим анализом установлено хромосомное замещение 2S(2D), был идентифицирован диагностический фрагмент маркера *Xgwm 47*. Также в этой линии был идентифицирован диагностический фрагмент маркера Sr39#22 (ген *Sr39/Lr35*). Следует отметить, что оба гена, *Sr47* и *Sr39*, локализованы в хромосоме 2S *Ae. speltoides*, причем *Sr39* – на коротком плече, а *Sr47* – на длинном (Klindworth et al., 2012). Поскольку у линии Л664 постулировано замещение 2S(2D), то вполне возможно присутствие у нее как гена *Sr39*, так и гена *Sr47*.

Ген *Sr38*, сцепленный с генами устойчивости к бурой (*Lr37*) и желтой (*Yr17*) ржавчинам, происходит от вида *Ae. ventricosa* Tausch. (Bariana, McIntosh, 1993). Несмотря на отсутствие данного вида в родословных интрогрессивных линий (см. табл. 1), диагностический фрагмент маркера VENTRIUP-LN2 к гену *Sr38* был найден у линии Л971. Цитогенетический анализ не выявил у нее генетического материала *Ae. ventricosa*, поэтому можно заключить, что в данном случае наблюдается ложноположительная идентификация гена *Sr38*.

Таким образом, надо обратить внимание на показанную в нашем исследовании недостаточную специфичность маркеров генов *Sr32* – csSr32#2, *Sr38* – VENTRIUP-LN2, *Sr39* – Sr39#22, *Sr47* – *Xgwm501* и *Xgpw4043*. Этот момент необходимо учитывать при идентификации генов устойчивости с использованием молекулярных маркеров у образцов пшеницы с чужеродным генетическим материалом. Также еще раз хочется отметить важность сочетания разных подходов при анализе интрогрессивных форм для повышения его эффективности.

Характеристика новых интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине

Результаты оценки устойчивости анализируемых линий к поволжским популяциям возбудителя стеблевой ржавчины на стадии проростков, полученные нами ранее (Баранова и др., 2023), представлены в Приложении 3. Показано, что к татарстанской популяции гриба, собранной с сорта Надира, были восприимчивы две линии – Л657 и Л971, причем Л971 была гетерогенна по устойчивости. К саратовской популяции, собранной с сорта Воевода, были восприимчивы линии Л758 и Л960. Шесть линий проявили устойчивость к обеим популяциям патогена (Л664, Л935, Л968, Л995/1, Л997, Л1110). Таким образом, характеристика интрогрессивных линий будет основываться на данных предыдущих работ (Баранова и др., 2023; Baranova et al., 2023) и результатов, полученных в настоящем исследовании.

По оценке KALRO (Кения), все линии, за исключением Л995/1, были высокоустойчивы к расе Ug99 (TTKSK) (см. табл. 2). Согласно данным FAO, к настоящему времени эффективность к расе Ug99 сохраняют гены *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp* (*T. aestivum* L.), *Sr2*, *Sr13*, *Sr14* (*T. turgidum* L.), *Sr22*, *Sr35* (*T. monococcum* L.), *Sr37* (*T. timopheevii* Zhuk.), *Sr32*, *Sr39*, *Sr47* (*Ae. speltoides* Tausch.), *Sr33*, *Sr45* (*Ae. tauschii* Coss.), *Sr40* (*T. araraticum* Jakubz.), *Sr25*, *Sr26*, *Sr43* (*Ag. elongatum* Host.), *Sr44* (*Ag. intermedium* Host.), *Sr27* и *Sr1A.1R* (*S. cereale* L.) (http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/stem-pathotypetracker/stem-effectivesrgenes/en). Ген *SrSatu* тоже эффективен против расы Ug99 (Olivera et al., 2013).

На основании проведенного ранее анализа вирулентности популяций патогена с сортов Надира и Воевода (Baranova et al., 2023) среди генов, наличие которых можно было предполагать у исследованных линий, только ген *Sr32* эффективен против обеих популяций гриба. Однако этот ген не выявлен ни у одной из линий. Помимо него, против татарстанской популяции возбудителя эффективен

ген *Sr39*, идентифицированный только у линии Л664. Следовательно, устойчивость линий к патогену определяется иными, не изученными генами или сочетаниями генов.

В трех линиях, устойчивых к поволжским популяциям гриба (Л935, Л968 и Л995/1), с помощью молекулярно-генетического анализа не удалось идентифицировать известные гены устойчивости. Две из них несут генетический материал *S. cereale*. Это линии Л935 и Л968 (см. табл. 1), в родословных которых был сорт тритикале Satu и которые, согласно цитогенетическому анализу, имеют хромосомное замещение 3R(3D) (см. табл. 2, рисунок, *д*). Они тоже оказались иммунными к расе Ug99. Линия Л968 иммунна также к желтой ржавчине (по результатам оценки KALRO), т. е. обладает групповой устойчивостью к возбудителям желтой и стеблевой ржавчин. Ген *SrSatu* локализован в хромосоме 3R ржи и тесно сцеплен с геном *LrSatu.* Кроме того, в хромосоме 3R локализован ген *Sr27* (Singh, McIntosh, 1988). Гены *Sr27* и *SrSatu*, согласно данным R.A. McIntosh (McIntosh et al., 1995), аллельны между собой и высокоэффективны по отношению к популяциям возбудителя стеблевой ржавчины. В более ранней работе S.J. Singh и R.A. Mclntosh в результате генетического анализа F_2 и F_3 гибридов устойчивых к стеблевой ржавчине сортов Satu (*SrSatu*) и Coorong (*Sr27*) с восприимчивыми сортами тритикале показали, что устойчивость каждого из сортов детерминируется одним доминантным геном и гены *SrSatu* и *Sr27* аллельны или тесно сцеплены (Singh, McIntosh, 1988). В этой статье показано, что использованный в скрещиваниях сорт Satu не нес гена *Sr27*. В наших исследованиях для гена *Sr27* получен тип реакции «1» на популяцию *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранную с сорта яровой мягкой пшеницы Воевода, и «2+» – с сорта Надира (Baranova et al., 2023), тогда как линии Л935 и Л968 показали тип реакции или «0;», или «1» (см. Приложение 3). С другой стороны, ген *Sr27* эффективен против Ug99, но линии с ним устойчивы или среднеустойчивы (R, MR) (Jin et al., 2007), а в проведенном нами исследовании линии были иммунными, тип реакции «0» (см. табл. 2). Таким образом, с учетом родословной, а также данных цитогенетического и фитопатологического анализов есть основания считать, что Л935 и Л968 несут ген *SrSatu*.

Устойчивость к поволжским популяциям гриба у линии Л995/1 (см. Приложение 3), вероятнее всего, определяется неидентифицированными генами на хромосоме 2G *T. timopheevii* (хромосомное замещение 2G(2B), или транслокация T2BS.2GL) (см. табл. 2). У Л995/1 донором чужеродных интрогрессий и устойчивости к возбудителю стеблевой ржавчины является сорт Памяти Майстренко. Как известно, этот сорт унаследовал хромосомное замещение 2B(2G) от линии яровой мягкой пшеницы «Саратовская 29 иммунная Л10», которая имеет возрастную устойчивость к возбудителю стеблевой ржавчины (Лайкова и др., 2013). Линия Л995/1 показала промежуточный тип устойчивости к расе Ug99 (5M).

В линиях Л664, Л997 и Л1110 идентифицированы гены устойчивости, присутствие которых подтверждается данными цитогенетического анализа (см. табл. 2) и анализа родословных (см. табл. 1). Л664 была устойчива к обеим популяциям гриба, собранным с сортов яровой мягкой пшеницы Воевода и Надира, и высокоустойчива (5RMR) к расе Ug99. У этой линии идентифицированы гены: *Sr25* (подтверждается наличием транслокации на 7DL от *Th. ponticum*, T7DS-7DL-7Ae#1L); *Sr39* и *Sr47*, которые локализованы на хромосоме 2S *Ae. speltoides* (McIntosh et al., 2013). Популяция *P. graminis* f. sp. *tritici* с сорта Воевода вирулентна к генам *Sr39* и *Sr25*, однако линия Л664 высокоустойчива, что может определяться дополнительным геном устойчивости от *Ae. speltoides – Sr47*. Тип реакции для линий с геном *Sr47* при заражении их расой Ug99 – «2–» (Klindworth et al., 2012), что соотносится с результатами оценки линии Л664 на устойчивость к Ug99 – 5RMR (см. табл. 2). Таким образом, есть основания заключить, что Л664 несет эффективную комбинацию генов *Sr25* + *Sr39* + *Sr47*.

Надо сказать, что использование источников гена *Sr25* в селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине традиционно для селекционных центров Поволжья. В 2009 г. появилось сообщение, что в Индии выявлен изолят гриба, вирулентный к этому гену (Jain et al., 2009). К сожалению, этот прежде высокоэффективный ген в последние годы теряет эффективность и на территории Поволжья (Баранова и др., 2021; Baranova et al., 2023). Однако *Sr25* все еще эффективен против расы Ug99 и может быть ценным для селекции в сочетании с другими генами, такими как *Sr31*, *Sr35* и *Sr36*, а в данном случае с генами *Sr39* и *Sr47.* Линии с материалом от *Ae. speltoides* с генами *Sr39* + *Sr47* весьма перспективны для селекции благодаря их эффективности против Ug99 (Klindworth et al., 2012). Среди отечественных сортов выделяется сорт Челяба 75 селекции Челябинского НИИСХ с генетическим материалом от *Ae. speltoides* (ген *Sr39*), который обладает не только групповой устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчинам и твердой головне (по данным оригинатора), но и устойчивостью к расе Ug99 (Шаманин и др., 2011).

Линии Л997 и Л1110 устойчивы к обеим поволжским популяциям *P. graminis* f. sp. *tritici*. У них идентифицированы гены *Sr25* (T7DS-7DL-7Ae#1L от *Th. ponticum*) и *Sr36* (2G(2B), или транслокация T2BS.2GL) (см. табл. 2, рисунок, *ж–и*). Устойчивость к возбудителю стеблевой ржавчины у этих линий определяется комбинацией *Sr25* + *Sr36* и, вероятно, неидентифицированным(-и) геном(-ами) от *T. timopheevii* в хромосоме $2A^t$. Это подтверждается иммунностью данных линий к Ug99, а также иммунностью линии Л997 к возбудителю желтой ржавчины.

Устойчивость линии Л960 к популяции стеблевой ржавчины с сорта Надира и ее средняя устойчивость к расе Ug99 (5MR), вероятнее всего, связана с неидентифицированными генами от *T. kiharae* (см. табл. 2).

Линия Л971 среднеустойчива к Ug99 (см. табл. 2). Она оказалась гетерогенной по устойчивости к популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранной с сорта яровой мягкой пшеницы Надира, и устойчива к популяции гриба с сорта Воевода (см. Приложение 3). Поскольку известно, что обе популяции вирулентны к ранее идентифицированному у данной линии гену *Sr25*, можно предположить наличие у нее других генов устойчивости, скорее всего, локализованных на хромосоме $2A^t$ *T. timopheevii* или/и на хромосоме 2G (см. табл. 2). Причем ген (гены) устойчивости отличаются от генов, перенесенных ранее от *T. timopheevii – Sr36* (T2B/2G#1) и *Sr40* (T2BL/2G#2S),

большей эффективностью, так как популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранные с сортов Надира и Воевода, вирулентны к ним (Baranova et al., 2023).

Устойчивость линии Л758 к расе Ug99 (5R) определяется геном *Sr25* – T7DS-7DL-7Ae#1L от *Th. ponticum* (см. табл. 2).

Линия Л657 устойчива к популяции стеблевой ржавчины, собранной с сорта пшеницы Воевода, и к расе Ug99 (5RMR), но не несет ни одного из протестированных *Sr* генов. Возможно, что не идентифицированные или неизвестные гены *Sr*, детерминирующие устойчивость этой линии, локализуются на хромосоме 6A *T. dicoccum*, заместившей у нее хромосому 6D (см. табл. 2, рисунок, *а*).

Таким образом, в результате фитопатологического, молекулярно-генетического и цитогенетического анализа выделены иммунные и устойчивые к поволжским популяциям гриба, а также к расе Ug99 (см. табл. 2) линии с эффективными сочетаниями генов устойчивости – *Sr25* + *Sr39* + *Sr47* (Л664), *Sr25* + *Sr36* (Л997 и Л1110), и с геном, предварительно определенным как *SrSatu* (Л935 и Л968). Линии Л657, Л960 и Л971 могут являться источниками новых генов устойчивости к стеблевой ржавчине.

Заключение

Проведенный цитогенетический анализ совместно с идентификацией с помощью ДНК-маркеров *Sr* генов и фитопатологической оценкой устойчивости к расе Ug99 *P. graminis* f. sp. *tritici* у интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы позволил: определить характер чужеродных интрогрессий; установить степень устойчивости к патогену; выявить эффективные *Sr* гены. В результате получена комплексная характеристика десяти интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к Ug99, что разрешает целенаправленно использовать их в селекции яровой мягкой пшеницы на устойчивость к возбудителю стеблевой ржавчины.

Список литературы / References

Баранова О.А., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Созина И.Д. Потеря эффективности генов устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr25* и *Sr6Agi* на территории Нижнего Поволжья. *Вестн. защиты растений*. 2021;104(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994
[Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Sozina I.D. Loss of effectiveness of stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr6Agi* in the Lower Volga region. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News.* 2021;104(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994 (in Russian)]

Баранова О.А., Сибикеев С.Н., Конькова Э.А. Анализ устойчивости к стеблевой ржавчине и идентификация *Sr*-генов у интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(1):177-186. DOI 10.30901/2227-8834-2023-1-177-186
[Baranova O.A., Sibikeev S.N., Konkova E.A. Analysis of resistance to stem rust and identification of *Sr* genes in introgressive lines of spring bread wheat. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(1):177-186. DOI 10.30901/2227-8834-2023-1-177-186 (in Russian)]

Василова Н.З., Асхадуллин Дам.Ф., Асхадуллин Дан.Ф. Эпифитотия стеблевой ржавчины на яровой пшенице в Татарстане. *Защита и карантин растений*. 2017;2:27-28
[Vasilova N.Z., Askhadullin Dam.F., Askhadullin Dan.F. Stem rust epiphytotic on soft spring wheat in Tatarstan. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2017;2:27-28 (in Russian)]

Гультяева Е.И., Орина А.С., Ганнибал Ф.Б., Митрофанова О.П., Одинцова И.Г., Лайкова Л.И. Эффективность молекулярных маркеров для выявления генов *Lr28*, *Lr35* и *Lr47* у мягкой пшеницы. *Генетика*. 2014;50(2):147-156. DOI 10.7868/S0016675814020064
[Gultyaeva E.I., Orina A.S., Gannibal Ph.B., Mitrofanova O.P., Odintsova I.G., Laikova L.I. The effectiveness of molecular markers for the identification of *Lr28*, *Lr35*, and *Lr47* genes in common wheat. *Russ. J. Genet*. 2014;50(2):131-139. DOI 10.1134/S1022795414020069]

Гультяева Е.И., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Шайдаюк Е.Л. Расширение генетического разнообразия сортов яровой мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.) в Нижнем Поволжье. *С.-х. биология.* 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus
[Gultyaeva E.I., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Shaydayuk E.L. Enlargement of genetic diversity of spring bread wheat resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in Lower Volga region. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology.* 2020;55(1):27-44. DOI 10.15389/agrobiology.2020.1.27eng]

Кельбин В.Н., Сколотнева Е.С., Салина Е.А. Возможности и перспективы формирования генетической защиты мягкой пшеницы от стеблевой ржавчины в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(8):821-828. DOI 10.18699/VJ20.679
[Kelbin V.N., Skolotneva E.S., Salina E.A. Challenges and prospects for developing genetic resistance in common wheat against stem rust in Western Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(8):821-828. DOI 10.18699/VJ20.679 (in Russian)]

Лайкова Л.И., Белан И.А., Бадаева Е.Д., Россеева Л.П., Шепелев С.С., Шумный В.К., Першина Л.А. Создание и изучение сорта яровой мягкой пшеницы «Памяти Майстренко» с интрогрессией генетического материала от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegilops tauschii* Coss. *Генетика*. 2013;49(1):103-112. DOI 10.7868/S0016675813010062
[Laikova L.I., Belan I.A., Badaeva E.D., Rosseeva L.P., Shepelev S.S., Shumny V.K., Pershina L.A. Development and study of spring bread wheat variety Pamyati Maystrenko with introgression of genetic material from synthetic hexaploid *Triticum timopheevii* Zhuk. × *Aegilops tauschii* Coss. *Russ. J. Genet.* 2013;49(1):89-97. DOI 10.1134/S1022795413010067]

Салина Е.А., Песцова Е.Г., Вершинин А.В. «Spelt1» – новое семейство тандемных повторов злаков. *Генетика*. 1997;33(4):437-442
[Salina E.A., Pestsova E.G., Vershinin A.V. "Spelt1" a novel family of tandemly repeated DNA in cereals. *Russ. J. Genet*. 1997;33(4):352-357]

Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Шаманин В.П., Бойко Н.И., Апарина В.А., Салина Е.А. Ген *Sr38*: значение для селекции мягкой пшеницы в условиях Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):740-745. DOI 10.18699/VJ21.084
[Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Shamanin V.P., Boyko N.I., Aparina V.A., Salina E.A. The gene *Sr38* for bread wheat breeding in Western Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):740-745. DOI 10.18699/VJ21.084]

Шаманин В.П., Моргунов А.И., Чурсин А.С., Меркешина Н.Н., Штубей Т.Ю., Левшунов М.А., Каракоз И.И. Представляет ли стеблевая ржавчина угрозу урожаю пшеницы в условиях Западной Сибири. *Успехи соврем. естествознания*. 2011;2:56-60
[Shamanin V.P., Morgunov A.I., Chursin A.S., Merkeshina N.N., Shtubey T.Yu., Levshunov M.A., Karakoz I.I. Does stem rust pose a threat to the wheat harvest in Western Siberia. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2011;2:56-60 (in Russian)]

Badaeva E.D., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosome of diploid species. *Genome*. 1996;39(2):293-306. DOI 10.1139/g96-040

Badaeva E.D., Ruban A.S., Aliyeva-Schnorr L., Municio C., Hesse S., Houben A. In situ hybridization to plant chromosomes. In: Liehr T. (Ed.) Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide. Springer protocols handbooks. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2017;477-494. DOI 10.1007/978-3-662-52959-1_49

Baranova O., Solyanikova V., Kyrova E., Kon'kova E., Gaponov S., Sergeev V., Shevchenko S., Mal'chikov P., Dolzhenko D., Bespalova L., Ablova I., Tarhov A., Vasilova N., Askhadullin Dm., Askhadullin Dn., Sibikeev S. Evaluation of resistance to stem rust and identification of *Sr* genes in Russian spring and winter wheat cultivars in the Volga region. *Agriculture*. 2023;13(3):635. DOI 10.3390/agriculture13030635

Bariana H.S., McIntosh R.A. Cytogenetic studies in wheat. XV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. *Genome*. 1993;36(3):476-482. DOI 10.1139/g93-065

Bedbrook R.J., Jones J., O'Dell M., Thompson R.J., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*. 1980;19(2):545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2

Cui Y., Zhang Y., Qi J., Wang H., Wang R.R.C., Bao Y., Li X. Identification of chromosomes in *Thinopyrum intermedium* and wheat *Th. intermedium* amphiploids based on multiplex oligonucleotide probes. *Genome.* 2018;61(7):515-521. DOI 10.1139/gen-2018-0019

Friebe B., Jiang J., Knott D.R., Gill B.S. Compensation indexes of radiation-induced wheat *Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf rust and stem rust. *Crop Sci.* 1994;34(2):400-404. DOI 10.2135/cropsci1994.0011183X003400020018x

Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests current status. *Euphytica*. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277

Gultyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Gannibal P.B. Leaf rust resistance genes in wheat cultivars registered in Russia and their influence on adaptation processes in pathogen populations. *Agriculture*. 2021;11(4):319. DOI 10.3390/agriculture11040319

Gultyaeva E., Shaydayuk E., Kosman E. Virulence diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in common wheat in Russian regions in 2019–2021. *Agriculture*. 2022;12(11):1957. DOI 10.3390/agriculture12111957

Jain S.K., Prashar M., Bhardwaj S.C., Singh S.B., Sharma Y.P. Emergence of virulence to *Sr25* of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on wheat in India. *Plant Dis*. 2009;93(8):840. DOI 10.1094/PDIS-93-8-0840B

Jiang J., Gill B.S. Different species-specific chromosome translocation in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Res*. 1994;2(1):59-64. DOI 10.1007/BF01539455

Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A., Yahyaoui A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 2007;91(9):1096-1099. DOI 10.1094/PDIS-91-9-1096

Klindworth D.L., Niu Z., Chao S., Friesen T.L., Faris J.D., Cai X., Xu S.S. Introgression and characterization of a goatgrass gene for a high level of resistance to Ug99 stem rust in tetraploid wheat. *G3* (*Bethesda*). 2012;2(6):665-673. DOI 10.1534/g3.112.002386

Knott D.R. The Wheat Rust – Breeding for Resistance. (Ser. Monographs on Theoretical and Applied Genetics). Berlin: Springer-Verlag, 1989. DOI 10.1007/978-3-642-83641-1

Lewis C.M., Persoons A., Bebber D.P., Kigathi R.N., Maintz J., Findlay K., Bueno-Sancho V., Corredor-Moreno P., Harrington S.A., Kangara N., Berlin A., García R., German S.E., Hanzalová A., Hodson D.P., Hovmøller M.S., Huerta-Espino J., Imtiaz M., Mirza J.I., Justesen A.F., Niks R.E., Omarani A., Patpour M., Pretorius Z.A., Roohparvar R., Sela H., Singh R.P., Steffenson B., Visser B., Fenwick P.M., Thomas J., Wulff B.B.H., Saunders D.G.O. Potential for re-emergence of wheat stem rust in the United Kingdom. *Commun. Biol*. 2018;1:13. DOI 10.1038/s42003-018-0013-y

McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts: An atlas of resistant genes. CSIRO Publication, Collingwood, 1995. DOI 10.1007/978-94-011-0083-0

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12th International Wheat Genetics Symposium. 8–13 September 2013. Yokohama, Japan, 2013. https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneCatalogueIntroduction.pdf

McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Xia X.C., Raupp W.J. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2022 Supplement. *Annu. Wheat Newsl*. 2022;68:68-81

Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(19):4321-4325. DOI 10.1093/nar/8.19.4321

Olivera P.D., Pretorius Z.A., Badebo A., Jin Y. Identification of resistance to races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with broad virulence in triticale (×*Triticosecale*). *Plant Dis*. 2013;97:479-484. DOI 10.1094/PDIS-05-12-0459-RE

Patpour M., Hovmøller M.S., Rodriguez-Algaba J., Randazzo B., Villegas D., Shamanin V.P., Berlin A., Flath K., Czembor P., Hanzalova A., Sliková S., Skolotneva E.S., Jin Y., Szabo L., Meyer K.J.G., Valade R., Thach T., Hansen J.G., Justesen A.F. Wheat stem rust back in Europe: diversity, prevalence and impact on host resistance. *Front. Plant Sci.* 2022;13:882440. DOI 10.3389/fpls.2022.882440

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;26(5):496-500. DOI 10.1139/cjr48c-033

Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Koebner R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103(4):618-624. DOI 10.1007/PL00002918

Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Rep*. 1986;4(2):104-109. DOI 10.1007/BF02732107

Ruban A.S., Badaeva E.D. Evolution of the S-genomes in *Triticum-Aegilops* alliance: evidences from chromosome analysis. *Front. Plant Sci*. 2018;9:1756. DOI 10.3389/fpls.2018.01756

Salina E.A., Adonina I.G., Vatolina T.Y., Kurata N. Comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch and related species. *Genetica*. 2004;122(3):227-237. DOI 10.1007/s10709-004-5602-7

Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Scherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Y., Zoshchuk S.A., Leitch A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome*. 2006;49(8):1023-1035. DOI 10.1139/g06-050

Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed.* 2003;122(5):396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x

Schubert I., Shi F., Fuchs J., Endo T.R. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant J*. 1998;14(4):489-495. DOI 10.1046/j.1365-313X.1998.00125.x

Singh S.J., Mclntosh R.A. Allelism of two genes for stem rust resistance in triticale. *Euphytica*. 1988;38:185-189. DOI 10.1007/BF00040190

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2023. После доработки 05.03.2024. Принята к публикации 05.03.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):387-397

DOI 10.18699/vjgb-24-44

Трансгенерационное влияние пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла

А.В. Вьюшина, А.В. Притворова, С.Г. Пивина, Н.Э. Ордян

Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
PritvorovaAV@infran.ru

Аннотация. Исследовано влияние стресса у беременных самок крыс Вистар на поведение и показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) в неокортексе, гиппокампе и гипоталамусе у поколения самок F2 в течение эстрального цикла. Беременных самок подвергали ежедневному 1-часовому иммобилизационному стрессу с 15-го по 19-й день беременности. Далее из рожденных пренатально стрессированных и контрольных самцов и самок крыс поколения F1 формировали семейные группы: группа 1 – контрольные самка и самец, группа 2 – контрольная самка и пренатально стрессированный самец, группа 3 – пренатально стрессированная самка и контрольный самец, группа 4 – пренатально стрессированные самка и самец. Рожденных от этих семейных пар самок поколения F2 отбирали в четыре экспериментальные группы в соответствии с семейной группой. В возрасте трех месяцев у крыс исследовали показатели поведения в тесте «открытое поле» в двух стадиях полового цикла – эструсе и диэструсе. Через 7–10 дней крыс декапитировали и производили отбор неокортекса, гипоталамуса и гиппокампа для определения уровня диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа и степени окисленности липидов (индекса Клейна). У самок F2 с одним пренатально стрессированным родителем отсутствует межстадиальная разница в локомоторно-исследовательской активности и тревожности. Если оба родителя F1 являются пренатально стрессированными, самки крыс F2 сохраняют межстадиальные различия, схожие с контрольным паттерном, при этом по абсолютным значениям у них снижаются локомоторно-исследовательская активность и время нахождения в центре открытого поля. В неокортексе у самок F2 в группах с пренатально стрессированными матерями снижается уровень первичных продуктов ПОЛ и повышается уровень оснований Шиффа в стадии эструса. В гиппокампе у самок F2 в группах с пренатально стрессированными отцами снижается уровень оснований Шиффа в стадии эструса, а уровень первичных продуктов ПОЛ повышается в группе 2 и снижается в группе 4. В гипоталамусе у самок F2 в группах с пренатально стрессированными матерями уровень оснований Шиффа повышается в стадии эструса и снижается в диэструсе, кроме того, в группе 3 повышается уровень первичных продуктов ПОЛ в стадии эструса. Таким образом, выявлено влияние пренатального стресса как матери F1, так и отца F1 на показатели поведения и уровень ПОЛ в неокортексе, гиппокампе и гипоталамусе у самок крыс поколения F2 в эструсе и диэструсе.

Ключевые слова: пренатальный стресс; поколение F2; поведение; перекисное окисление липидов; эструс; диэструс.

Для цитирования: Вьюшина А.В., Притворова А.В., Пивина С.Г., Ордян Н.Э. Трансгенерационное влияние пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):387-397. DOI 10.18699/vjgb-24-44

Финансирование. Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4).

Transgenerational effect of prenatal stress on behavior and lipid peroxidation in brain structures of female rats during the estral cycle

A.V. Vyushina, A.V. Pritvorova, S.G. Pivina, N.E. Ordyan

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
PritvorovaAV@infran.ru

Abstract. The effect of stress in pregnant female Wistar rats on the behavior and lipid peroxidation (LP) in the neocortex, hippocampus and hypothalamus in the female F2 generation during the ovarian cycle was investigated. We subjected pregnant females to daily 1-hour immobilization stress from the 15th to the 19th days of pregnancy. Further, family groups were formed from prenatally stressed and control male and female rats of the F1 generation: group 1, the control female and male; group 2, the control female and the prenatally stressed male; group 3, the

© Вьюшина А.В., Притворова А.В., Пивина С.Г., Ордян Н.Э., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

prenatally stressed female and the control male; group 4, the prenatally stressed female and male. The females of the F2 generation born from these couples were selected into four experimental groups in accordance with the family group. At the age of 3 months, behavior of rats was studied in the "open field" test in two stages of the ovarian cycle – estrus and diestrus. After 7–10 days, the rats were decapitated and the neocortex, hypothalamus and hippocampus were selected to determine the level of diene and triene conjugates, Schiff bases and the degree of lipid oxidation (Klein index). In F2 females with one prenatally stressed parent, there was no interstage difference in locomotor-exploratory activity and anxiety. If both F1 parents were prenatally stressed, female F2 rats retained interstage differences similar to the control pattern, while their locomotor-exploratory activity and time spent in the center of an "open field" decreased in absolute values. In the neocortex of F2 females in groups with prenatally stressed mothers, the level of primary LP products decreased and the level of Schiff bases increased in the estrus stage. In the hippocampus of F2 females in the groups with prenatally stressed fathers, the level of Schiff bases decreased in the estrus stage, and the level of primary LP products increased in group 2 and decreased in group 4. In the hypothalamus of F2 females in the groups with prenatally stressed mothers, the level of Schiff bases increased in the estrus stage and decreased in the diestrus; in addition, in group 3, the level of primary LP products in the estrus stage increased. Thus, we demonstrated the influence of prenatal stress of both F1 mother and F1 father on the behavior and the level of LP in the neocortex, hippocampus and hypothalamus in female rats of the F2 generation in estrus and diestrus.
Key words: prenatal stress; F2 generation; behavior; lipid peroxidation; estrus; diestrus.

For citation: Vyushina A.V., Pritvorova A.V., Pivina S.G., Ordyan N.E. Transgenerational effect of prenatal stress on behavior and lipid peroxidation in brain structures of female rats during the estral cycle. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):387-397. DOI 10.18699/vjgb-24-44

Введение

В настоящее время установлено, что рост уровня материнских глюкокортикоидов в течение беременности вызывает у потомства перестройки в нейроэндокринной и иммунной системах. Повышенный уровень глюкокортикоидов у матери способствует избыточному продуцированию активных форм кислорода (АФК), при этом орган-специфический ответ на стресс зависит от относительного баланса между генерацией АФК и антиоксидантными способностями клетки (Dennery, 2010; Thompson, Al-Hasan, 2012). Нарушение такого баланса приводит к окислительному стрессу и способствует эпигенетическим изменениям у пренатально стрессированного потомства. Эпигенетические изменения сохраняются в ряде митотических делений соматических клеток, а также могут передаваться следующим поколениям, если эти изменения произошли в половых клетках (Дыбан, 1988; Rodgers, Bale, 2015; Yao et al., 2021). Таким образом, многочисленные негативные последствия материнского стресса, выявленные у первого поколения, могут сохраняться и у последующих поколений (Essex et al., 2013; Provençal, Binder, 2015).

У самок и эпигенетические изменения, и материнское поведение оказывают влияние на потомство, поэтому исследование трансгенерационного влияния стресса у самцов грызунов имеет явные преимущества по сравнению с самками (Brunton, 2013; Bale, 2014). В связи с этим трансгенерационные изменения, вызванные воздействием стресса у самок, остаются малоизученными. В настоящее время особое внимание исследователей обращено на изменения фертильности у крыс поколения F2 и последующих поколений. Так, в экспериментальных работах (Zhang et al., 2020; Piquer et al., 2022) установлено, что пренатальные нефизиологические воздействия различного генеза изменяют фертильность и во втором, и в третьем поколении. Это выражается в изменении ряда морфометрических показателей яичников и матки, биохимических показателей, таких как уровень кортикостерона, лютеинезирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона, инсулина и других метаболических показателей в сыворотке крови, а также в нарушении эстрального цикла. В других исследованиях установлено, что пренатальный стресс оказывает трансгенерационное влияние на процессы свободнорадикального окисления биомолекул в различных тканях (Aiken et al., 2019).

Эпигенетические изменения потенциально могут влиять на эндокринное программирование и развитие мозга у плода в течение нескольких поколений. В обзоре (Babenko et al., 2015) авторы подчеркивают сложную взаимосвязь между воздействием пренатального стресса на изменения экспрессии микроРНК и метилирования ДНК в плаценте и головном мозге и повышенным риском развития психических заболеваний.

Можно предположить, что пренатальный стресс, вызывающий эпигенетические изменения, становится одним из наиболее мощных факторов, влияющих на психическое здоровье. Причем такие изменения затрагивают, в том числе и различные отделы мозга, связанные с нейроэндокринной системой и когнитивными способностями. В работе (Huerta-Cervantes et al., 2021) отмечается, что когнитивные нарушения у самок крыс в разных стадиях цикла могут быть сопряжены с нарушениями в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гиппокампе и неокортексе.

Перекисное окисление липидов – не только универсальный модификатор свойств биологических мембран, но и важный физиологический регулятор их структуры, фактор, устанавливающий и поддерживающий стационарное функционирование ферментов, каналообразователей, рецепторов. Интенсивность свободнорадикальных процессов ПОЛ, находящаяся под контролем эндогенных окислителей, взаимосвязана с составом и физическим состоянием фосфолипидов биологических мембран (их текучестью), с их чувствительностью к сигналам лигандов и экстремальным воздействиям и имеет чрезвычайно важное значение для регуляторной и информационной роли мембран в нормально протекающем метаболизме. Окис-

лительные процессы, влияющие на состав и вязкость липидного слоя мембран, способны осуществлять регуляцию клеточного метаболизма (Барабой и др., 1992).

Изменение поведения в разные стадии цикла у крыс связано с подготовкой к успешной репродуктивной функции. Изменение межстадийных особенностей поведения может быть следствием изменения фертильности. Таким образом, представляет интерес исследование трансгенерационного влияния пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла.

Материалы и методы

Работа проведена на животных из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (г. Санкт-Петербург) с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных Директивой N 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, использующихся для научных целей» (Страсбург, 22 сентября 2010 г.) (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes). Опыты проводили на крысах Вистар (рис. 1).

Получение экспериментальных групп потомства F2. *Этап 1.* В эксперименте использовали самок крыс Вистар поколения F0 весом 280–300 г, которых содержали в условиях нормального цикла свет/темнота (12/12 ч) при +22 °С в клетках для лабораторных мышей и крыс М-6 («Профлаб», Россия), свободном доступе к воде и комбикорму для лабораторных животных марки ЛБК-120 Тосненского комбикормового завода. Самок крыс спаривали с самцами F0, оплодотворение подтверждали обнаружением сперматозоидов во влагалищном мазке и обозначали как нулевой день беременности. Беременные самки были случайным образом разделены на две группы: контрольные беременные крысы для получения контрольного потомства F1 (n = 12) и крысы, которых подвергли в дальнейшем стрессу для получения пренатально стрессированного потомства F1 (n = 12).

Этап 2. Для получения пренатально стрессированного потомства F1 беременных самок F0 подвергали одночасовому иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности с 15-го по 19-й день гестации (Ордян, Пивина, 2003). Процедуру стрессирования проводили в одно и то же время суток с 14.00 и до 15.00 ч. Выбор сроков стрессирования обусловлен тем, что именно в этот период происходит интеграция всех звеньев нейроэндокринной регуляции и завершается созревание гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (Rice, Barone, 2000).

Контрольных и стрессированных беременных самок содержали по 4–5 особей в клетке. По достижении 20-го дня беременности их рассаживали в индивидуальные клетки. Полученное потомство на второй день жизни подсчитывали, учитывая число самцов и самок в пометах, а сами пометы выравнивали до 8–10 крысят с равным соотношением полов. Крысята находились с матерью 30 дней без ограничения доступа к воде и пище. Далее пренатально стрессированное потомство F1 рассаживали в клетки, отделяя самцов от самок. Контрольное потомство F1, рожденное интактными самками F0, также на второй день жизни выравнивали и в возрасте 30 дней отделяли от матери – раздельно самцы и самки.

Этап 3. Животных для дальнейшего разведения отбирали случайным образом независимым лицом. Для получения потомства F2 составляли семейные группы из потомства F1 из расчета 1 самец на 3 самки, так, чтобы животные не были сибсами. Семейные группы составляли с таким расчетом, чтобы в дальнейшем получить

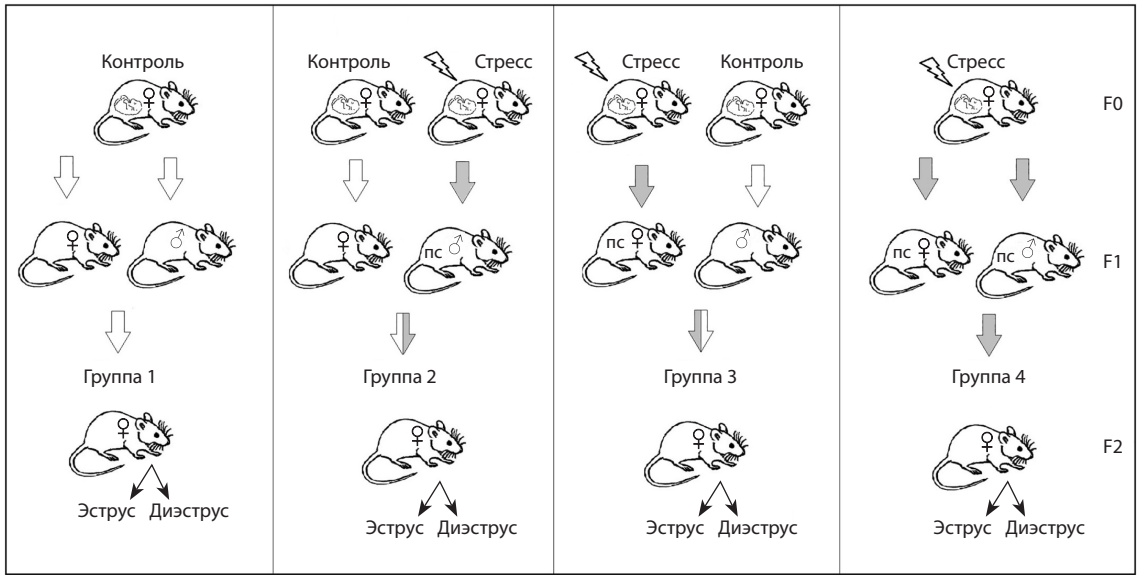


Рис. 1. Схема опыта.

Группа 1 – потомство F2, рожденное от родителей, не подвергавшихся воздействиям; группа 2 – потомство F2, рожденное от матери, не подвергавшейся воздействиям, и пренатально стрессированного (ПС) отца; группа 3 – потомство F2, рожденное от пренатально стрессированной матери и отца, не подвергавшегося воздействиям; группа 4 – потомство F2, рожденное от пренатально стрессированных отца и матери.

следующие экспериментальные группы: группа 1 (к+к) – потомство, полученное от самок F1 и самцов F1 из контрольной группы, не подвергавшейся воздействиям; группа 2 (к+2) – потомство, полученное от самок F1 контрольной группы и самцов F1 пренатально стрессированной группы; группа 3 (2+к) – потомство, полученное от самок F1 пренатально стрессированной группы и самцов F1 из контрольной группы; группа 4 (2+2) – потомство, полученное от самок F1 и самцов F1 из пренатально стрессированной группы.

После получения потомства F2 родившихся крысят на второй день жизни подсчитывали, учитывая число самцов и самок в пометах, а сами пометы так же, как и в случае потомства F1, выравнивали до 8–10 крысят с равным соотношением полов. Крысята находились с матерью 30 дней без ограничения доступа к воде и пище. Далее потомство F2 рассаживали в клетки по 5–7 особей в каждой, отделяя самцов и самок. Для дальнейших исследований отбирали самок в возрасте 3 месяцев.

Предварительно крыс подвергали хэндлингу и приучали к взятию вагинальных мазков в течение трех недель. Далее тестировали поведение животных, сразу после проведения тестирования у крыс брали вагинальные мазки и определяли стадию цикла. Через две недели после тестирования поведения крыс декапитировали. Непосредственно после декапитации еще раз брали контрольные вагинальные мазки.

Исследование поведения. Тестирование поведения животных выполняли в тесте «открытое поле» (ОП), представляющее собой четырехугольную камеру размером 90 × 90 × 50 см, пол которой был расчерчен на квадраты размером 15 × 15 см каждый. Освещенность камеры составляла 300 лк. Тестирование проводили с 10.00 до 13.00 ч. Крысу помещали в центр арены и в течение 5 мин регистрировали общее время в центре, число пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность или локомоторная активность), число вертикальных стоек без упора (вертикальная двигательная активность или исследовательская активность), длительность реакции груминга и время неподвижности (замирание). Показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности свидетельствуют о локомоторно-исследовательской активности. Общее время в центре, время неподвижности и время реакции груминга показывают степень тревожности у крыс.

Определение уровня перекисного окисления липидов. После декапитации из черепной коробки извлекали мозг и производили на льду выделение следующих структур: неокортекса, гиппокампа и гипоталамуса. Далее проводили экстракцию липидов по методу Фолча.

Для определения уровня диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и индекса Клейна сухой липидный остаток, полученный методом Фолча, растворяли в смеси метанол:гептан (2:1) и измеряли оптическую плотность – уровень ДК на волне 230 нм и уровень ТК на волне 274 нм. Результаты выражали в единицах оптической плотности на 1 мг фосфолипидов (Арутюнян и др., 2000). Содержание оснований Шиффа (ОШ) определяли флюориметрическим методом при максимуме возбуждения 365 нм и максимуме испускания 425 нм (Bidlack, Tappel, 1973), выражая в относительных единицах флюоресценции на 1 мг фосфолипидов.

Количество фосфолипидов оценивали по содержанию неорганического фосфора методом Бартлетта. В основе метода лежит реакция взаимодействия неорганического фосфата с молибдатом аммония, в результате чего образуется фосфорномолибденовая кислота, которая затем восстанавливается эйконогеном с образованием окрашенных оксидов молибдена, оптическую плотность раствора которых измеряют при длине волны 830 нм.

Для определения степени окисленности липидов подсчитывали индекс Клейна следующим образом: спектрофотометрически определяли оптическую плотность липидных экстрактов при длине волны 215 нм и рассчитывали соотношение оптических плотностей при 233 и 215 нм.

Определение уровня ДК, ТК, количества фосфолипидов и индекса Клейна проводили с использованием спектрофотометра BioTek PowerWave HT (США). Уровень ОШ определяли с помощью спектрофлюориметра Hitachi MPF-4 (Япония).

Все реагенты, используемые при биохимических анализах, приобретены в фирме «Вектон» (Россия), за исключением эйконогена (Merck, Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Данные анализировали с помощью параметрического критерия Стьюдента и непараметрического U-теста Манна–Уитни после того, как была проведена оценка нормальности распределения значений в выборках с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как M ± SEM – показатели поведения, а также в виде медиан (Me) и интерквартильного размаха (IQR) между значениями 25 и 75 перцентилей – биохимические показатели. Проводили сравнения каждого показателя в стадии эструса и диэструса для выявления межстадийных различий в каждой из четырех исследованных групп. А также сравнивали значения каждого показателя как в стадии эструса, так и в стадии диэструса в группах 2, 3 и 4 по сравнению с группой 1. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Поведение

В группе контроля по всем показателям наблюдаются различия между стадиями цикла (рис. 2).

Показатели горизонтальной двигательной активности, вертикальной двигательной активности и времени нахождения в центре ОП у самок в стадии эструса выше, чем у самок в стадии диэструса, тогда как время неподвижности и время груминга ниже у самок в стадии эструса. Можно заключить, что в группе контроля у самок в стадии эструса повышена двигательная и исследовательская активность и снижена тревожность (по показателям в тесте ОП), что, по-видимому, представляет эволюционно целесообразную стратегию, связанную с половым поведением.

В группе к+2 горизонтальная и вертикальная двигательные активности, а также время в центре у самок крыс F2 не отличаются в стадиях эструса и диэструса. Показатели

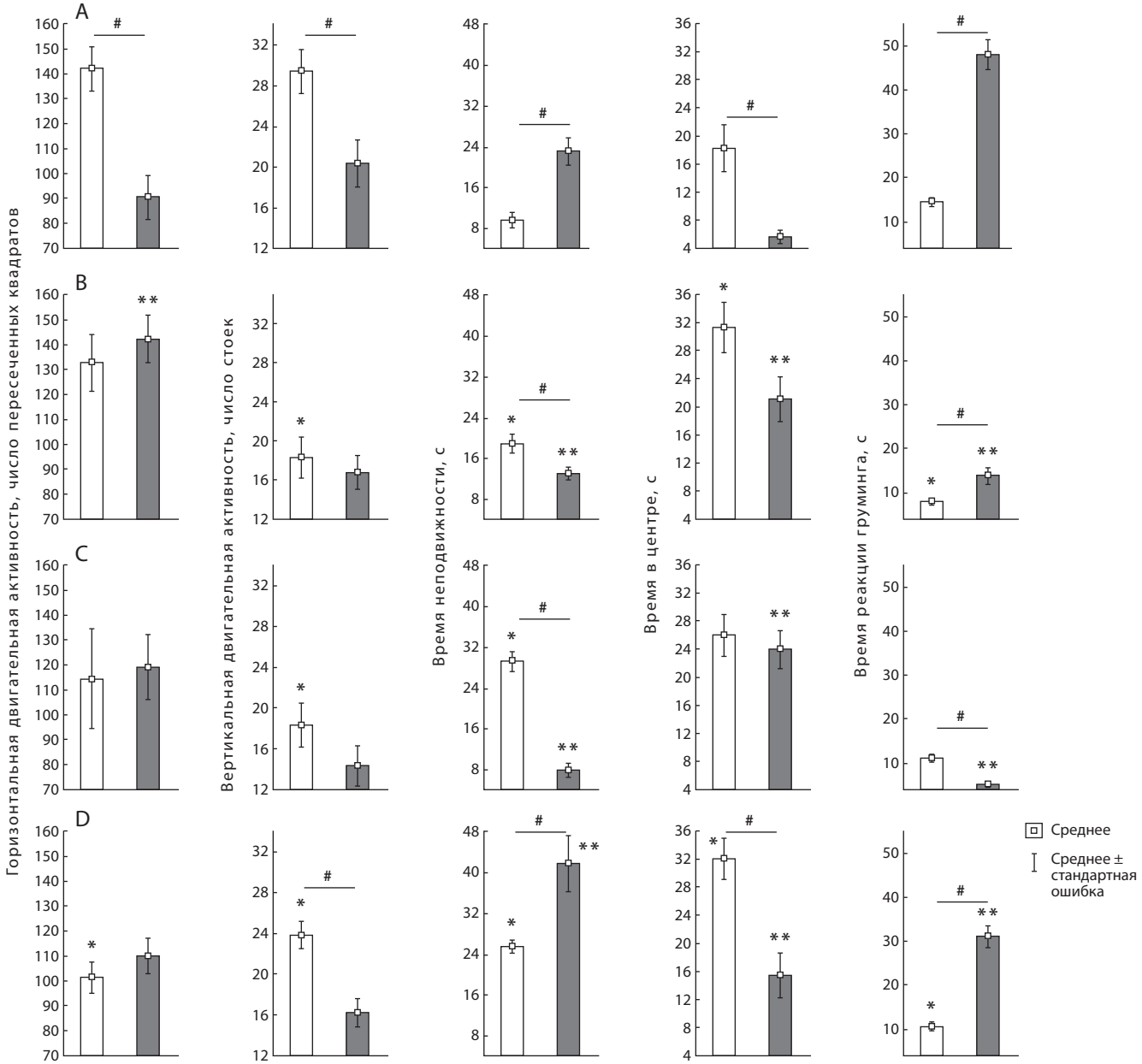


Рис. 2. Показатели поведения у крыс в тесте «открытое поле».

Здесь и на рис. 3–5: светлые столбики – крысы в стадии эструса, темные – крысы в стадии диэструса. Панель A – группа 1 (контрольные крысы); панель B – группа 2 (контрольная мать и ПС отец; панель C – группа 3 (ПС мать и контрольный отец); панель D – (ПС мать и ПС отец). # Статистически значимые отличия крыс в стадии диэструса от крыс в стадии эструса, $p < 0.05$; * статистически значимые отличия от контроля в стадии эструса, $p < 0.05$; ** статистически значимые отличия от контроля у животных в стадии диэструса, $p < 0.05$.

«время неподвижности» и «время реакции груминга» демонстрируют межстадиальную разницу. Самки F2 в диэструсе становятся более подвижными и менее тревожными по сравнению с контролем. У самок F2 в эструсе снижается исследовательская активность, увеличивается время неподвижности, увеличивается время нахождения в центре, т. е. самки становятся менее тревожными. На основании вышеописанных изменений мы предполагаем, что самки F2 в период, наиболее благоприятный для спаривания, становятся менее подвижными по сравнению с контролем, и, соответственно, снижается вероятность их встречи с партнером. В то же время самки, находящиеся в стадии диэструса, по исследованным показателям поведения приближаются к самкам, находящимся в стадии эструса в контрольной группе.

В группе 2+к показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности и время в центре у самок крыс F2 не отличаются в стадиях эструса и диэструса. Показатели «время неподвижности» и «время реакции груминга» демонстрируют межстадиальную разницу, которая инвертирована по отношению к контролю. Самки F2 в диэструсе менее подвижны, меньше грумируют и предпочитают находиться в центре ОП, т. е. у них снижена тревожность по сравнению с контролем. У самок F2 в эструсе снижается исследовательская активность и увеличивается время неподвижности по сравнению с контролем, кроме

того, крысы данной группы в эструсе менее подвижны, чем самки этой группы в диэструсе. Таким образом, и в этой группе у самок в стадии эструса произошло искажение поведения, связанного с поиском партнера.

В группе 2+2 у самок крыс F2 по всем показателям, кроме горизонтальной двигательной активности, наблюдаются различия между стадиями цикла. Самки F2 в диэструсе менее подвижны и более тревожны по сравнению с контролем. У самок F2 в эструсе также отмечаются снижение локомоторно-исследовательской активности и повышение тревожности по сравнению с контролем. Тем не менее межстадиальное соотношение у самок данной группы остается схожим с межстадиальным соотношением у контрольной группы, однако по абсолютным значениям показателей поведения самки группы 2+2 отличаются от контрольной группы увеличением тревожности.

Неокортекс

В группе контроля наблюдаются различия между стадиями цикла только по показателю ОШ: в стадии эструса уровень конечных продуктов реакций переокисления липидов в 2 раза ниже по сравнению со стадией диэструса (рис. 3).

В группе к+2 уровень ОШ в стадии диэструса в 2 раза ниже, чем в группе контроля, однако показатели других исследованных продуктов ПОЛ не отличаются от уровня группы контроля. Межстадиальные различия отсутствуют.

В группе 2+к у самок F2 относительно показателей контроля уровень ДК и ТК – начальных продуктов ПОЛ – ниже, а уровень ОШ – конечных продуктов – выше. Следует отметить, что показатели ДК и индекс Клейна демонстрируют межстадиальную разницу.

Уровни ДК, ТК и индекс Клейна в группе 2+2 ниже относительно соответствующих показателей контроля в обе стадии цикла, за исключением ТК в эструсе. Уровень ОШ в эструсе в 3 раза выше, чем в группе контроля. Можно заключить, что в группе 2+2 уровень показателей ПОЛ ниже по сравнению с контролем, в особенности в стадии диэструса, исключая показатель ОШ. Следует отметить, что все исследованные показатели ПОЛ этой группы демонстрируют межстадиальную разницу.

Таким образом, группы к+к, и к+2 в неокортексе сходны по своему профилю уровней ДК, ТК и индекса Клейна, тогда как группы 2+2 и 2+к выделяются снижением этих показателей ПОЛ в неокортексе. В то же время показатели

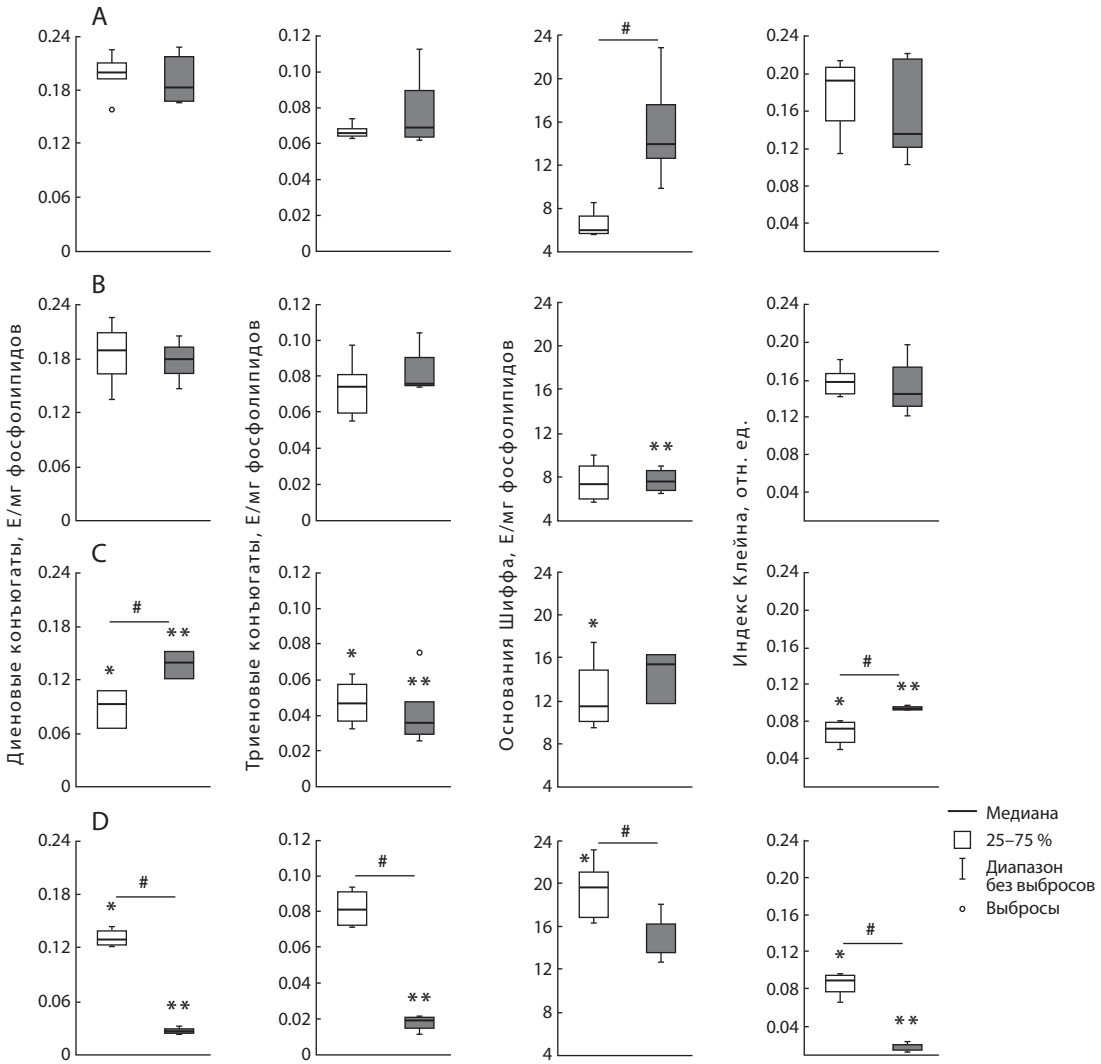


Рис. 3. Уровень ДК, ТК, ОШ и индекс Клейна в неокортексе у самок крыс в экспериментальных группах.

ОШ этих групп в стадии эструса значительно выше показателей контроля, тогда как в диэструсе резким снижением этого показателя характеризуется только группа к+2.

Гиппокамп

В группе контроля наблюдаются различия между стадиями цикла только по показателю ОШ: в стадии эструса уровень конечных продуктов реакций переокисления липидов в 2 раза выше по сравнению со стадией диэструса (рис. 4).

В группе к+2 уровень ДК в стадии эструса и диэструса выше показателей контроля, уровень ТК в диэструсе выше показателей контроля. Уровень ОШ в стадии эструса в 2 раза ниже, чем в группе контроля. Значения индекса Клейна в диэструсе выше, чем в контроле. Можно заключить, что уровень показателей начальных продуктов ПОЛ выше по сравнению с контролем, в особенности в стадии диэструса, однако для этой группы характерно отсутствие межстадиальных различий.

В группе 2+к уровень ОШ в стадии диэструса ниже относительно уровня контроля. В диэструсе отличия ДК, ТК и индекса Клейна относительно показателей контроля отсутствуют. При этом для ДК, ОШ и индекса Клейна наблюдается межстадиальная разница.

Уровни ДК в группе 2+2 в обеих стадиях цикла ниже относительно значений в группе контроля. Уровень ТК характеризуется отсутствием межстадиальных различий и отличий от группы контроля. Показатель ОШ в стадии эструса в 3 раза ниже по сравнению с группой контроля, а отличия в диэструсе по сравнению с контролем отсутствуют. Индекс Клейна в стадии эструса и диэструса ниже относительно соответствующих показателей контроля. В группе 2+2 уровень показателей ПОЛ ниже по сравнению с контролем и имеются межстадиальные различия в уровнях как начальных, так и конечных продуктов ПОЛ. Обращает на себя внимание, что группы 2+к и 2+2 демонстрируют межстадиальную разницу показателей перекисного окисления липидов.

Гипоталамус

В группе контроля наблюдаются различия между стадиями цикла по показателю ТК и ОШ. Уровень этих продуктов ПОЛ выше в стадии диэструса по сравнению со стадией эструса (рис. 5).

В группе к+2 уровень ОШ в стадии диэструса ниже, чем в группе контроля. Уровень ДК и индекс Клейна в диэструсе в 3 раза выше уровня контроля. Отличия уров-

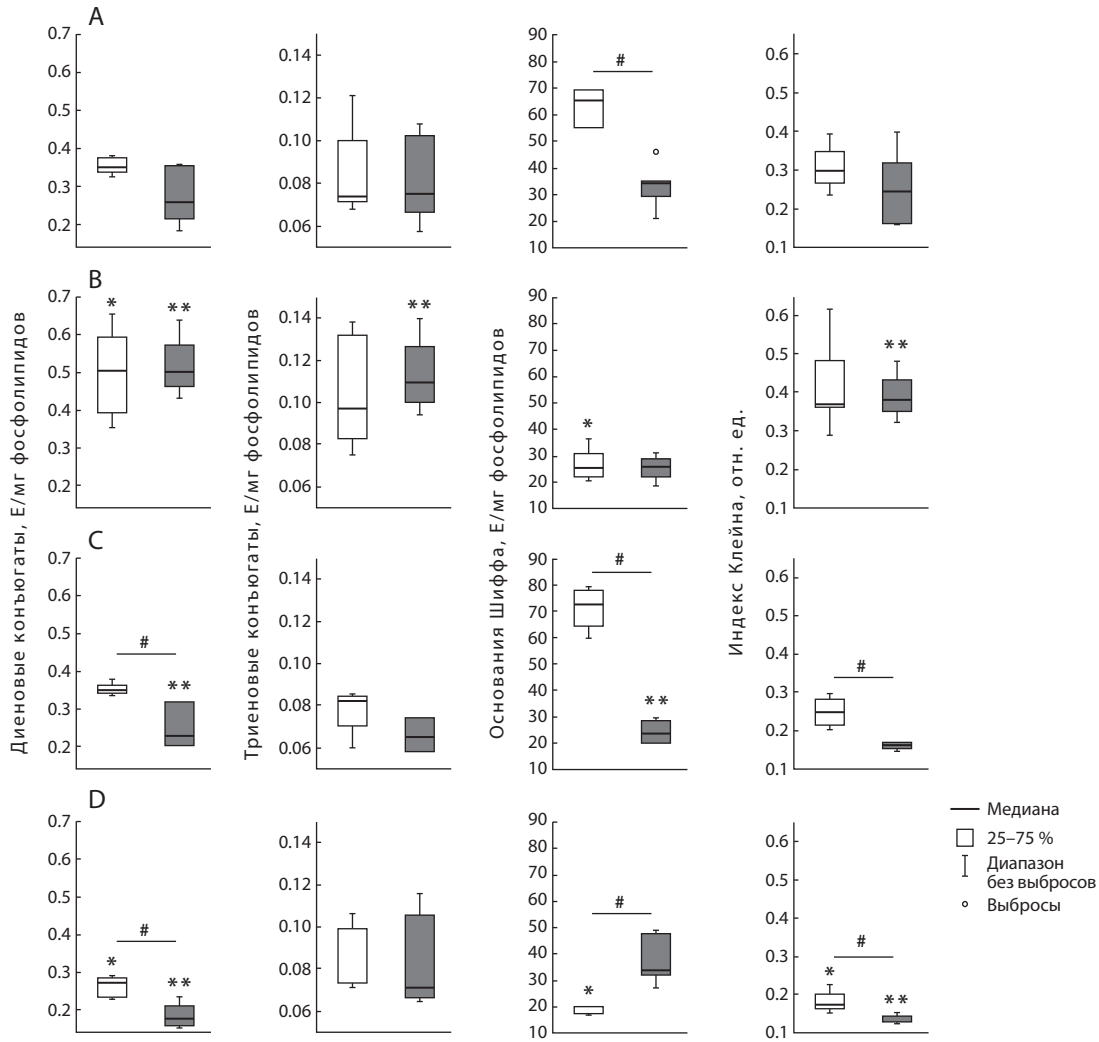


Рис. 4. Уровень ДК, ТК, ОШ и индекс Клейна в гиппокампе у самок крыс в экспериментальных группах.

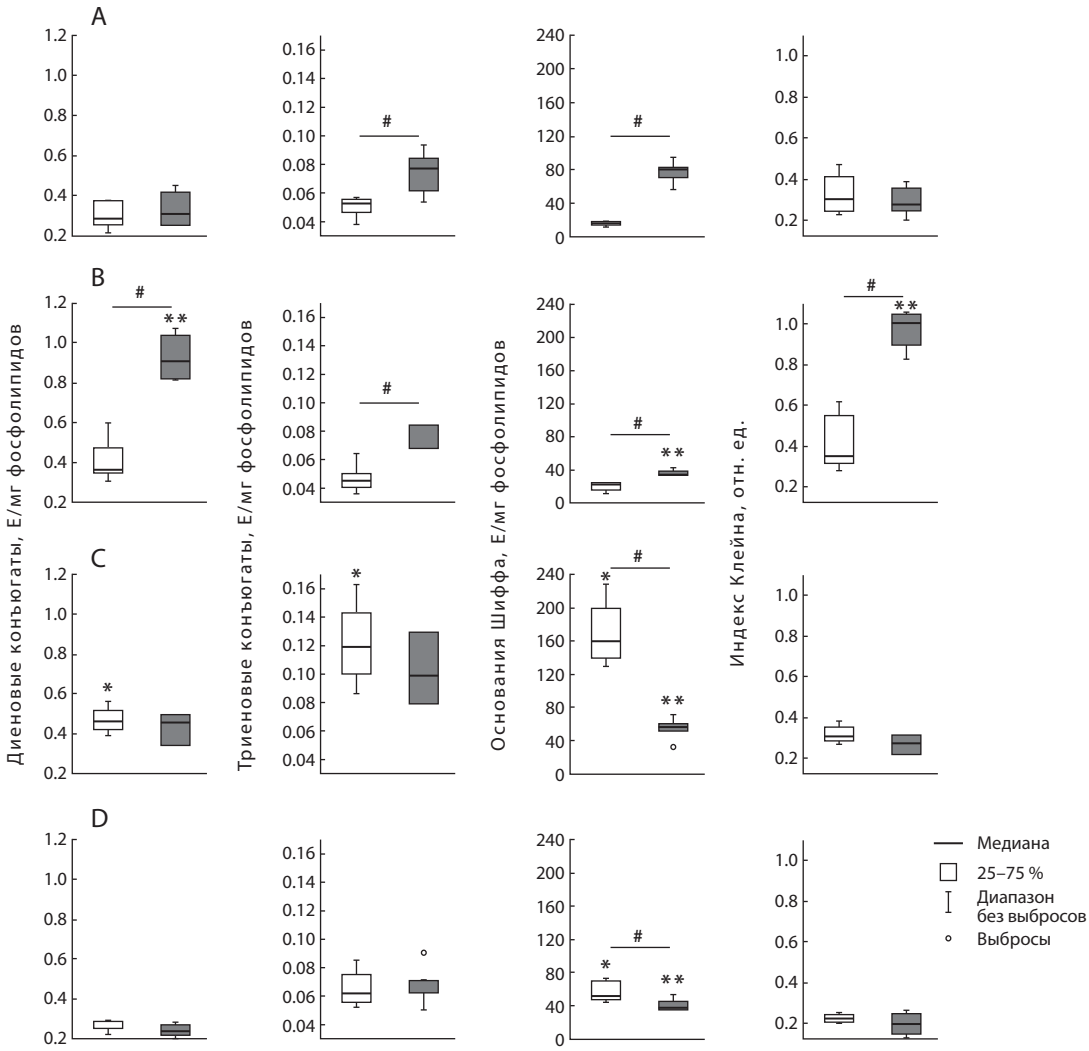


Рис. 5. Уровень ДК, ТК, ОШ и индекс Клейна в гипоталамусе у самок крыс в экспериментальных группах.

ня ТК от контроля в этой группе отсутствуют. Для всех исследованных показателей ПОЛ характерны межстадиальные различия.

В группе 2+к уровень ОШ в эструсе выше относительно показателей контроля в 10 раз, а в диэструсе ниже. Уровни ДК и ТК в стадии эструса выше по сравнению с контрольной группой. Межстадиальная разница есть только у показателя ОШ, и она инвертирована по отношению к контролю.

Показатель ОШ в группе 2+2 в стадии эструса в 3 раза выше по сравнению с группой контроля, при этом в диэструсе уровень ОШ ниже, чем в контроле в 2 раза. Для остальных показателей ПОЛ межстадиальные и межгрупповые различия отсутствуют.

Обращает на себя внимание сходство у групп к+к и 2+2 в уровне начальных и промежуточных показателей ПОЛ. В то же время уровни ОШ группы 2+2 в эструсе и диэструсе инвертированы относительно контроля. Также привлекают внимание многократное увеличение по сравнению с контролем начальных продуктов ПОЛ и показателя окисленности (индекс Клейна) в диэструсе у группы к+2 и уровень ОШ в стадии эструса у группы 2+к.

Обсуждение

Повышение уровня материнских глюкокортикоидов во время беременности может приводить к стойким эпигенетическим изменениям. В работах (Guilbert et al., 2012; Matthews, Phillips, 2012) отмечается, что эпигенетические изменения могут сохраняться на протяжении последующих поколений.

В связи с изменившимся социальным положением женщины в последние десятилетия произошел сдвиг репродуктивного возраста в более поздние возрастные когорты. Наличие большого числа вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволяет женщинам осуществлять деторождение даже в случае значительных патологий. Однако негативные последствия в ряде поколений таких патологических беременностей в настоящее время только начинают осознаваться (Aiken et al., 2015; Sanches-Garrido et al., 2022).

В обзоре (Левинсон и др., 2022) авторы отмечают многофакторность гормональных воздействий при проблеме нарушений репродуктивной функции. При анализе неудач применения ВРТ выявлено не только значение гипоталамических нарушений, но и влияние паракринных факто-

ров яичника. В то же время в исследовании, выполненном в нашей лаборатории, обнаружено, что негативное воздействие пренатального стресса на морфометрические показатели матки, связанные с нарушением цикла половых гормонов, отмечается только у молодых самок крыс в возрасте 3 месяцев, тогда как у более возрастных животных такие нарушения нивелируются (Пивина и др., 2010). Однако в исследовании B. Piquer с коллегами (2022) обнаружено снижение фертильности самок крыс, выраженное в нарушении оплодотворения и количества родившихся крысят после пренатального стресса вплоть до поколения F4. Этими же авторами показано нарушение морфометрических показателей яичников и матки и нарушения эстрального цикла до поколения F4. Как отмечают А.Л. Левинсон с коллегами, несмотря на то, что исследования последствий психоэмоционального стресса широко представлены как в медицинской, так и в научной биологической литературе, посвященной экспериментам на лабораторных моделях, эти два направления развиваются во многом независимо (Левинсон и др., 2022). Можно предположить, что неудачи в применении ВРТ могут быть вызваны, в том числе и трансгенерационными воздействиями стресса.

В различных экспериментальных моделях трансгенерационной передачи эпигенетических изменений отмечаются нарушения фертильности потомков-самок на протяжении нескольких поколений (Guilbert et al., 2012; Moisiadis et al., 2017; Adams, Smith, 2020). Кроме того, действие пренатального стресса на трансгенерационные изменения у самцов и самок потомства различно (Grundwald, Brunton, 2015; Zaidan, Gaisler-Salomon, 2015; Zhang et al., 2020; Huerta-Cervantes et al., 2021). При этом воздействие оказывают как пренатально стрессированные матери, так и отцы.

По нашим данным, поведение самок контрольной группы 1 в стадии диэструса характеризуется повышенными показателями тревожности, тогда как в эструсе снижена тревожность и повышена локомоторная и исследовательская активность. Эти данные соответствуют более ранним исследованиям (Mora et al., 1996; Marcondes et al., 2001; Miller et al., 2021), где изменения поведения в указанные стадии цикла связаны с различным гормональным профилем. Очевидно, эта взаимосвязь – результат того, что в структурах мозга присутствуют рецепторы к половым гормонам, вызывающим эволюционно целесообразные поведенческие реакции, связанные с размножением (Резников и др., 2004).

Изменение уровня ПОЛ считается важным показателем дестабилизации мембран (Левицкий, Губский, 1994) и может служить причиной нарушения молекулярной структуры мембран, что в свою очередь выражается и в изменении поведения (Moisiadis et al., 2017). В то же время процессы ПОЛ, протекающие в рамках физиологической нормы, являются механизмом регуляции физико-химического состояния мембран и, соответственно, связанных с мембранами структур – рецепторов и ионных каналов (Halliwell, Gutteridge, 2007). Данные, полученные в нашем исследовании, позволяют сделать вывод (на основании изменений показателя ОШ), что в эструсе происходят снижение вязкости и увеличение пластичности мембран в неокортексе и обратные изменения в гиппокампе. При этом в гипоталамусе в стадии эструса изменения уровня ПОЛ и, соответственно, изменения физико-химического состояния мембран сходны с неокортексом, но более выражены. По-видимому, изменения в поведении в стадии эструса, по сравнению с диэструсом, требуют соответствующих изменений в мембранах и связанных с ними структур (рецепторов и ионных каналов).

Пренатальный стресс отца является при объяснении результатов более понятным методом изучения механизмов эпигенетической передачи, чем эксперименты с пренатально стрессированными матерями, которые оказывают дополнительное воздействие на потомство F2 материнским поведением, родами и лактацией (Bale, 2015). Обнаружение измененного фенотипа в случае эксперимента с пренатально стрессированным отцом может считаться достоверным доказательством трансгенерационной передачи эпигенетических изменений во втором поколении (Dunn et al., 2011).

Наше исследование показало, что в группе 2, где один из родителей – пренатально стрессированный отец, поведение в разные стадии цикла не соответствует задачам репродуктивного поведения, следовательно, можно сделать косвенный вывод о нарушении гормональной регуляции полового поведения. Рассматривая результаты изменения ПОЛ, мы видим, что физико-химические свойства мембран неокортекса у крыс в диэструсе характеризуются повышенным уровнем пластичности мембран по показателю ОШ в сравнении с контролем. В гиппокампе изменения разных продуктов ПОЛ разнонаправленны по сравнению с контролем, но с учетом такого показателя, как индекс Клейна, характеризующего степень окисленности липидов, можно сделать вывод о повышении уровня ПОЛ в диэструсе по сравнению с группой контроля. При этом в гипоталамусе изменения показателей ПОЛ в стадии эструса, по сравнению с диэструсом, сходны с контролем, но более выражены.

Таким образом, изменение уровня ПОЛ в исследованных структурах мозга, вероятно, также вносит вклад в изменение полового поведения самок группы, где одним из родителей является пренатально стрессированный отец. Можно заключить, что пренатальный стресс отца вносит весомый вклад в репродуктивный паттерн дочерей, в том числе через биохимические процессы, связанные с окислением биомолекул.

Пренатальный стресс матери – дополнительный стрессирующий фактор, поскольку потомство F2 воспитывается самкой с нарушением материнского поведения (Граф и др., 2012). Однако поведение группы 3, где пренатальному стрессу подвергалась мать, демонстрирует искажение поведения самок как в эструсе, так и в диэструсе, сходное с группой 2. Процессы ПОЛ в неокортексе показывают разбалансировку между начальными и конечными продуктами, за счет чего происходят изменения по сравнению с контролем. Так, появляется межстадиальная разница в показателях ДК и индекса Клейна при снижении этих показателей относительно контрольных, в то время как показатель конечных продуктов ПОЛ – ОШ в стадии эструса

превышает значения в группе контроля, вследствие чего исчезает межстадиальная разница.

В гиппокампе основные изменения касаются снижения показателей ПОЛ в диэструсе относительно контроля, тогда как в гипоталамусе, напротив, показатели ПОЛ возрастают в эструсе относительно значений контроля. По-видимому, нарушения поведения в разные стадии цикла могут быть в этой группе, в том числе следствием изменения физико-химических свойств мембран исследованных структур: дисбаланса в неокортексе и межстадиальными искажениями процессов ПОЛ в гиппокампе и гипоталамусе (увеличением пластичности мембран гиппокампа в диэструсе и снижением пластичности мембран гипоталамуса в эструсе). Таким образом, пренатально стрессированная мать влияет на изменения репродуктивного паттерна дочерей по-разному в разные стадии цикла. Вероятно, на возможные эпигенетические изменения самок F2 накладывается и влияние нарушений материнского поведения пренатально стрессированных самок F1.

В литературе имеются сведения о кумулятивном влиянии пренатального стресса обоих родителей на потомство (Adams, Smith, 2020). В наших исследованиях в группе 4, где пренатальному стрессу подвергались оба родителя, поведение самок потомства F2 демонстрирует увеличение тревожности в обе стадии цикла. Перекисное окисление липидов в неокортексе этой группы претерпевает изменения по сравнению с группой контроля, за счет чего появляется значительная межстадиальная разница по всем показателям ПОЛ. Сходный профиль межстадиальных различий наблюдается и в гиппокампе. В гипоталамусе ОШ инвертированы по стадиям относительно контрольной группы. Можно предположить, что одной из причин увеличения тревожности в независимости от стадии эстрального цикла в этой группе может быть изменение процессов ПОЛ в неокортексе и гиппокампе. Возможно, что кумулятивный эффект пренатального стресса обоих родителей проявляется в этой группе однозначным изменением поведения в обе стадии цикла и нарушением ПОЛ в неокортексе.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о трансгенерационном влиянии пренатального стресса на процессы ПОЛ и поведение у поколения F2 самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла.

Пренатальный стресс отца или матери изменяет процессы ПОЛ в неокортексе, гиппокампе и гипоталамусе поколения F2 самок крыс таким образом, что физико-химическое состояние мембран этих структур мозга не соответствует задачам стадий эстрального цикла, при этом пренатальный стресс отца вызывает наибольшие изменения процессов ПОЛ в гипоталамусе, а пренатальный стресс матери – в неокортексе. Поведение в обоих случаях не соответствует репродуктивным задачам.

Пренатальный стресс обоих родителей поколения F2 самок крыс оказывает наибольшее влияние на изменение процессов ПОЛ в изученных структурах мозга, снижая интенсивность перекисного окисления липидов. Поведение характеризуется повышением тревожности в обе стадии цикла.

Список литературы / References

Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб.: Фолиант, 2000
[Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. Methods of Evaluation of Free-radical Oxidation and the Antioxidant System. Saint Petersburg: Foliant Publ., 2000 (in Russian)]

Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992
[Baraboy V.A., Brekhman I.I., Golotin V.G., Kudriashov Yu.B. Peroxidation and Stress. Saint Petersburg: Nauka Publ., 1992 (in Russian)]

Граф А.В., Дунаева Т.Ю., Маклакова А.С., Маслова М.В., Соколова Н.А., Трофимова Л.К. Трансгенерационные последствия острого антенатального стресса беременных крыс. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 2012;98(3):331-341
[Graf A.V., Dunaeva T.Y., Maklakova A.S., Maslova M.V., Sokolova N.A., Trofimova L.K. Transgenerational consequences of acute antenatal stress in pregnant rats. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology.* 2012;98(3):331-341 (in Russian)]

Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. Л., 1988
[Dyban A.P. Early Development of Mammals. Leningrad, 1988 (in Russian)]

Левинсон А.Л., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2022;26(5):431-441. DOI 10.18699/VJGB-22-53
[Levinson A.L., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Amstislavsky S.Ya. Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2022;26(5):431-441. DOI 10.18699/VJGB-22-53 (in Russian)]

Левицкий Е.Л., Губский Ю.И. Свободнорадикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки. *Украинский биохимический журнал.* 1994;66(4):18-30
[Levytskyi E.L., Gubskĭ Iu.Y. Free radical damage of the nuclear genetic apparatus of cells. *Ukrainskiy Biokhimicheskiy Zhurnal = The Ukrainian Biochemical Journal.* 1994;66(4):18-30 (in Russian)]

Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Характеристика поведения и стрессореактивности гипофизарно-адреналовой системы пренатально стрессированных крыс. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 2003;89(1):52-59
[Ordyan N.E., Pivina S.G. Behavioral characteristics and stress reaction of the pituitary-adrenal system in prenatally stressed rats. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology.* 2003;89(1):52-59 (in Russian)]

Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Шамолина Т.С., Ордян Н.Э. Изменение морфометрических характеристик матки крыс под действием пренатального стресса. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2010;96(6):621-626
[Pivina S.G., Rakitskaya V.V., Shamolina T.S., Ordyan N.E. Change of the uterus morphometric parameters in the prenatally stressed rats. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology.* 2010;96(6):621-626 (in Russian)]

Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мыслицкий В.Ф. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы: Медакадемия, 2004
[Reznikov A.G., Pishak V.P., Nosenko N.D., Tkachyuk S.S., Myslitskiy V.F. Prenatal Stress and Neuroendocrine Pathology. Chernivtsi: Medacademia Publ., 2004 (in Russian)]

Adams R.C.M., Smith C. *In utero* exposure to maternal chronic inflammation transfers pro-inflammatory profile to generation F2 via sex-

specific mechanisms. *Front. Immunol.* 2020;11:48. DOI 10.3389/fimmu.2020.00048

Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E. Transgenerational developmental programming of ovarian reserve. *Sci. Rep.* 2015;5:16175. DOI 10.1038/srep16175

Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Spiroski A., Nuzzo A.M., Ashmore T.J., Rolfo A., Sutherland M.J., Camm E.J., Giussani D.A., Ozanne S.E. Chronic gestational hypoxia accelerates ovarian aging and lowers ovarian reserve in next-generation adult rats. *FASEB J.* 2019;33(6):7758-7766. DOI 10.1096/fj.201802772R

Babenko O., Kovalchuk I., Metz G.A.S. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;48:70-91. DOI 10.1016/j.neubiorev.2014.11.013

Bale T.L. Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming. *Dialogues Clin. Neurosci*. 2014;16(3):297-305. DOI 10.31887/DCNS.2014.16.3/tbale

Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16(6):332-344. DOI 10.1038/nrn3818

Bidlack W.R., Tappel A.L. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids.* 1973;8(4):203-207. DOI 10.1007/BF02544636

Brunton P.J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction*. 2013;146(5):R175-R189. DOI 10.1530/REP-13-0258

Dennery P.A. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic. Biol. Med.* 2010;49(7):1147-1151. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.011

Dunn G.A., Morgan C.P., Bale T.L. Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Horm. Behav.* 2011;59(3):290-295. DOI 10.1016/j.yhbeh.2010.05.004

Essex M.J., Boyce W.T., Hertzman C., Lam L.L., Armstrong J.M., Neumann S.M.A., Kobor M.S. Epigenetic vestiges of early developmental adversity: childhood stress exposure and DNA methylation in adolescence. *Child Dev.* 2013;84(1):58-75. DOI 10.1111/j.1467-8624.2011.01641.x

Grundwald N.J., Brunton P.J. Prenatal stress programs neuroendocrine stress responses and affective behaviors in second generation rats in a sex-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;62:204-216. DOI 10.1016/j.psyneuen.2015.08.010

Guilbert F., Lumineau S., Kotrschal K., Mostl E., Richard-Yris M., Houdelier C. Trans-generational effects of prenatal stress in quail. *Proc. Biol. Sci.* 2012;280(1753):20122368. DOI 10.1098/rspb.2012.2368

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 2007

Huerta-Cervantes M., Peña-Montes D.J., López-Vázquez M.A., Montoya-Pérez R., Cortés-Rojo C., Olvera-Cortés M.E., Saavedra-Molina A. Effects of gestational diabetes in cognitive behavior, oxidative stress and metabolism on the second-generation off-spring of rats. *Nutrients.* 2021;13(5):1575. DOI 10.3390/nu13051575

Marcondes F.K., Miguel K.J., Melo L.L., Spadari-Bratfisch R.C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav*. 2001;74(4-5):435-440. DOI 10.1016/s0031-9384(01)00593-5

Matthews S.G., Phillips D.I. Transgenerational inheritance of stress pathology. *Exp. Neurol*. 2012;233(1):95-101. DOI 10.1016/j.expneurol.2011.01.009

Miller C.R., Halbing A.A., Patisaul H.B., Meitzen J. Interaction of the estrous cycle, novelty and light on female and male rat open field locomotor ant anxiety-related behaviors. *Physiol. Behav.* 2021;228:113203. DOI 10.1016/j.physbeh.2020.113203

Moisiadis V.G., Constantinof A., Kostaki A., Szyf M., Matthews S. Prenatal glucocorticoid exposure modifies endocrine function and behavior for 3 generations following maternal and paternal transmission. *Sci. Rep.* 2017;7(1):11814. DOI 10.1038/s41598-017-11635-w

Mora S., Dussaubat N., Diaz-Veliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1996;21(7):609-620. DOI 10.1016/s0306-4530(96)00015-7

Piquer B., Ruz F., Barra R., Lara H.E. Gestational sympathetic stress programs the fertility of offspring: a rat multi-generation study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19(5):3044. DOI 10.3390/ijerph19053044

Provençal N., Binder E.B. The effect of early life stress on the epigenome: from the womb to adulthood and even before. *Exp. Neurol.* 2015;268:10-20. DOI 10.1016/j.expneurol.2014.09.001

Rice D., Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect*. 2000;108(Suppl. 3):511-533. DOI 10.1289/ehp.00108s3511

Rodgers A.B., Bale T.L. Germ cell origins of posttraumatic stress disorder risk: the transgenerational impact of parental stress experience. *Biol. Psychiatry.* 2015;78(5):307-314. DOI 10.1016/j.biopsych.2015.03.018

Sanches-Garrido M.A., Garcia-Galiano D., Tena-Sempere M. Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. *Hum. Reprod. Update.* 2022;28(3):346-375. DOI 10.1093/humupd/dmac005

Thompson L.P., Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *J. Pregnancy.* 2012;2012:582748. DOI 10.1155/2012/582748

Yao S., Lopes-Tello J., Sferruzzi-Perri A.N. Developmental programming of the female reproductive system – a review. *Biol. Reprod.* 2021;104(4):745-770. DOI 10.1093/biolre/ioaa232

Zaidan H., Gaisler-Salomon I. Prereproductive stress in adolescent female rats affects behavior and corticosterone levels in second-generation offspring. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;58:120-129. DOI 10.1016/j.psyneuen.2015.04.013

Zhang H.-L., Yi M., Li D., Li R., Zhao Y., Qiao J. Transgenerational inheritance of reproductive and metabolic phenotypes in PCOS rats. *Front. Endocrinol*. 2020;11:144. DOI 10.3389/fendo.2020.00144

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.09.2023. После доработки 19.12.2023. Принята к публикации 09.02.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):398-406

DOI 10.18699/vjgb-24-45

Действие амисульприда на экспрессию серотониновых рецепторов, нейротрофического фактора BDNF и его рецепторов при сверхэкспрессии склонного к агрегации тау-белка с мутацией [R406W] у мышей

Е.М. Кондаурова#, А.А. Комарова#, Т.В. Ильчибаева, А.Я. Родный, Е.А. Заливина, В.С. Науменко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
kond_em@bionet.nsc.ru

Аннотация. Серотониновые рецепторы 5-HT_7 (5-HT7R) привлекают все больше внимания в качестве одного из важных звеньев в механизмах развития болезни Альцгеймера и возможной мишени для лечения различных тау-патологий. В настоящей работе исследовано влияние амисульприда (обратный агонист 5-HT7R) в модели экспериментального повышения экспрессии гена, кодирующего склонный к агрегации белок человека Tau[R406W], в префронтальной коре мышей линии C57BL/6J на кратковременную память и экспрессию генов, участвующих в развитии таупатии (*Htr7* и *Cdk5*), а также биомаркеров нейродегенеративных процессов – гена *Bdnf* и его рецепторов TrkB (ген *Ntrk2*) и $p75^{NTR}$ (ген *Ngfr*). В тесте на кратковременную память мыши не было обнаружено разницы по индексу дискриминации между мышами, которым вводили AAV-Tau[R406W], и мышами с AAV-EGFP. Амисульприд не повлиял на данный показатель. Введение AAV-Tau[R406W] привело к повышению экспрессии генов *Htr7*, *Htr1a* и *Cdk5* в префронтальной коре по сравнению с животными группы AAV-EGFP. При этом амисульприд в дозе 10 мг/кг у животных группы AAV-Tau[R406W] вызвал снижение уровня мРНК генов *Htr7* и *Htr1a* по сравнению с животными группы AAV-Tau[R406W], которым вводили физиологический раствор. Выявлено снижение экспрессии генов *Bdnf* и *Ntrk2* в префронтальной коре после введения AAV-Tau[R406W]. При этом амисульприд в различных дозах (3 и 10 мг/кг) вызывал такое же снижение транскрипции этих генов у мышей без таупатии. Интересно также, что у мышей группы AAV-EGFP после введения амисульприда в дозе 10 мг/кг повышался уровень мРНК гена *Ngfr*. Полученные данные позволяют рассматривать амисульприд в качестве агента для восстановления нормальной функции тау-белка. Однако следует учитывать возможный негативный эффект амисульприда при длительном применении, отражающийся в увеличении экспрессии гена *Ngfr* и снижении экспрессии генов *Bdnf* и *Ntrk2*, что может указывать на усиление нейродегенеративных процессов.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; тау-белок; амисульприд; 5-HT_7-рецептор; киназа Cdk5; *Bdnf*; *Ngfr*; *Ntrk2*; мыши.

Для цитирования: Кондаурова Е.М., Комарова А.А., Ильчибаева Т.В., Родный А.Я., Заливина Е.А., Науменко В.С. Действие амисульприда на экспрессию серотониновых рецепторов, нейротрофического фактора BDNF и его рецепторов при сверхэкспрессии склонного к агрегации тау-белка с мутацией [R406W] у мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):398-406. DOI 10.18699/vjgb-24-45

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011).

Благодарности. Содержание и разведение животных поддержано бюджетным проектом FWNR-2022-0023.

Effect of amisulpride on the expression of serotonin receptors, neurotrophic factor BDNF and its receptors in mice with overexpression of the aggregation-prone [R406W] mutant tau protein

E.M. Kondaurova#, A.A. Komarova#, T.V. Ilchibaeva, A.Ya. Rodnyy, E.A. Zalivina, V.S. Naumenko

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
kond_em@bionet.nsc.ru

Abstract. Serotonin 5-HT_7 receptors (5-HT7R) are attracting increasing attention as important participants in the mechanisms of Alzheimer's disease and as a possible target for the treatment of various tau pathologies. In this study, we investigated the effects of amisulpride (5-HT7R inverse agonist) in C57BL/6J mice with experimentally induced expression of the gene encoding the aggregation-prone human Tau[R406W] protein in the prefrontal cortex. In these

© Кондаурова Е.М., Комарова А.А., Ильчибаева Т.В., Родный А.Я., Заливина Е.А., Науменко В.С., 2024

Авторы внесли равный вклад в работу

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

animals we examined short-term memory and the expression of genes involved in the development of tauopathy (*Htr7* and *Cdk5*), as well as biomarkers of neurodegenerative processes – the *Bdnf* gene and its receptors TrkB (the *Ntrk2* gene) and $p75^{NTR}$ (the *Ngfr* gene). In a short-term memory test, there was no difference in the discrimination index between mice treated with AAV-Tau[R406W] and mice treated with AAV-EGFP. Amisulpride did not affect this parameter. Administration of AAV-Tau[R406W] resulted in increased expression of the *Htr7*, *Htr1a*, and *Cdk5* genes in the prefrontal cortex compared to AAV-EGFP animals. At the same time, amisulpride at the dose of 10 mg/kg in animals from the AAV-Tau[R406W] group caused a decrease in the *Htr7*, *Htr1a* genes mRNA levels compared to animals from the AAV-Tau[R406W] group treated with saline. A decrease in the expression of the *Bdnf* and *Ntrk2* genes in the prefrontal cortex was revealed after administration of AAV-Tau[R406W]. Moreover, amisulpride at various doses (3 and 10 mg/kg) caused the same decrease in the transcription of these genes in mice without tauopathy. It is also interesting that in mice of the AAV-EGFP group, administration of amisulpride at the dose of 10 mg/kg increased the *Ngfr* gene mRNA level. The data obtained allow us to propose the use of amisulpride in restoring normal tau protein function. However, it should be noted that prolonged administration may result in adverse effects such as an increase in *Ngfr* expression and a decrease in *Bdnf* and *Ntrk2* expression, which is probably indicative of an increase in neurodegenerative processes.

Key words: Alzheimer's disease; tau protein; amisulpride; 5-HT_7 receptor; Cdk5 kinase; *Bdnf*; *Ngfr*; *Ntrk2*; mice.

For citation: Kondaurova E.M., Komarova A.A., Ilchibaeva T.V., Rodnyy A.Ya., Zalivina E.A., Naumenko V.S. Effect of amisulpride on the expression of serotonin receptors, neurotrophic factor BDNF and its receptors in mice with overexpression of the aggregation-prone [R406W] mutant tau protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):398-406. DOI 10.18699/vjgb-24-45

Введение

Хорошо известно, что тау-белок играет важную роль в поддержании структуры аксонов и их росте, влияет на формирование полярности нейронов, аксональный транспорт и нейропластичность (Arendt et al., 2012). Однако при гиперфосфорилировании тау-белок теряет нормальную способность стабилизировать микротрубочки и агрегирует в клетке с образованием патоморфологических структур – парных спиральных филаментов и нейрофибриллярных клубков (Grundke-Iqbal et al., 1986). Это приводит к нарушению функций тау-белка и вызывает различные таупатии, в том числе болезнь Альцгеймера (БА).

В настоящее время обнаружено более 50 различных патогенных мутаций гена *MAPT*, кодирующего тау-белок. Большинство из этих мутаций – экзонные, происходят в областях, кодирующих С-концевой домен, связывающий микротрубочки (Strang et al., 2019). Мутации в кодирующих последовательностях – в основном миссенс-мутации, хотя есть также данные о делециях (Rovelet-Lecrux et al., 2009). Наиболее распространенные их проявления – это нарушения связывания с микротрубочками и, как следствие, их дисфункция, в то время как влияние на склонность к агрегации тау-белка *in vivo* наблюдается лишь для некоторых мутаций (Xia et al., 2019).

Одна из мутаций гена *MAPT*, Tau[R406W], вызывает агрегацию белка из-за сниженной способности фосфорилированной формы связываться с микротрубочками (Perez et al., 2000). Данная мутация (находится в 13-м экзоне гена *MAPT*) приводит к замене аргинина на триптофан в позиции 406 (p.R406W) и вызывает семейную лобно-височную долевую дегенерацию с тау-патологией (FTLD-tau). Частота мутации p.R406W составляет 0.62 % среди пациентов с FTLD-tau и 0.26 % среди пациентов с БА (Gossye et al., 2023). Расположение этой мутации вблизи участка MTBR (microtubule-binding region) может влиять на способность этой области вызывать конформационные изменения в соседнем MTBR (Xia et al., 2019). Важным фактом является то, что мутация R406W располагается рядом с ключевыми аминокислотными остатками (Ser396, Ser404), которые фосфорилируются в тау-белке при формировании патологических парных спиральных филаментов (Hutton et al., 1998).

С другой стороны, известно, что серотониновая (5-НТ) система мозга также может играть важную роль в патологическом развитии и клинических проявлениях первичных таупатий, включая лобно-височную деменцию, прогрессирующий надъядерный паралич и кортикобазальную дегенерацию (Huey et al., 2006; Murley, Rowe, 2018). Свою функцию 5-НТ-система реализует посредством многочисленных рецепторов. В настоящее время увеличивается число исследований, направленных на изучение роли 5-НТ-рецепторов в механизмах развития таупатий и БА (Еремин и др., 2023).

В связи с этой проблемой особое внимание привлекают 5-HT_7-рецепторы (5-HT7R). Так, в недавних исследованиях было продемонстрировано, что конститутивная активность 5-HT7R индуцирует гиперфосфорилирование тау-белка и его последующую агрегацию посредством взаимодействия с киназой CDK5. Кроме того, применение высокоселективного обратного агониста 5-HT7R SB-269970 предотвращает индуцированное рецептором накопление и гиперфосфорилирование тау-белка (Labus et al., 2021).

Показано, что амисульприд (препарат, обладающий антипсихотическим, антидепрессантным и прокогнитивным эффектами) – сильный обратный агонист 5-HT7R, способен влиять на гиперфосфорилирование тау-белка. Терапевтический потенциал амисульприда в предотвращении/диспергировании агрегации тау-белка и тау-опосредованной патологии подтвержден *in vitro* (в клетках Tau-BiFC HEK293 и в кортикальных нейронах человека, несущих мутацию Tau[R406W]) и *in vivo* (у мышей, сверхэкспрессирующих мутантный Tau[R406W] белок человека в префронтальной коре, и у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный Tau[P301L] белок человека). В этих животных моделях таупатии лечение амисульпри-

дом предотвращало гиперфосфорилирование, агрегацию и нейротоксичность тау-белка, а также устраняло нарушения памяти у мышей обеих линий (Jahreis et al., 2023).

Кроме того, было показано, что хроническое введение амисульприда крысам линии OXYS – спорадической модели БА (Stefanova et al., 2015) – уменьшало фосфорилирование тау-белка в коре и гиппокампе 3-месячных животных (Molobekova et al., 2023). Помимо этого, в гиппокампе 1- и 3-месячных крыс амисульприд снижал еще и уровень мРНК гена киназы *Cdk5* (Molobekova et al., 2023).

Известно, что прогрессирование таупатий и БА вызывает развитие атрофии нервных клеток в коре головного мозга, гиппокампе и других подкорковых структурах (Bettens et al., 2010). Так, было обнаружено, что мутация Tau[R406W] вызывает нарушения в генах, связанных с нейрогенезом и синаптической функцией, в нейронах мышей (Minaya et al., 2023). Среди биомаркеров нейродегенеративных процессов широко известен нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), уровень мРНК и белка которого снижается при БА в коре больших полушарий и гиппокампе (Hock et al., 2000). Вызываемые BDNF процессы роста и развития нейронов опосредуются его рецепторами – тирозинкиназным рецептором B (TrkB) и общим рецептором нейротрофинов p75 ($p75^{NTR}$), связывающими BDNF и proBDNF соответственно. Накапливающиеся данные указывают на взаимосвязь между 5-HT и BDNF; предполагается, что обе системы могут контролировать функции друг друга, действуя через общие внутриклеточные сигнальные пути. Баланс в функционировании систем 5-HT и BDNF, по-видимому, является принципиальным для развития нормального фенотипа (Popova, Naumenko, 2019).

Цель настоящей работы – исследование влияния амисульприда в модели экспериментального повышения экспрессии гена Tau[R406W] (при помощи аденоассоциированного вирусного конструкта *in vivo*) в префронтальной коре на кратковременную память и экспрессию генов *Htr7* и *Cdk5*, участвующих в развитии таупатии, а также гена BDNF и его рецепторов (*Ntrk2* (кодирует TrkB) и *Ngfr* (кодирует $p75^{NTR}$)) у мышей.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты проводили на 2-месячных самцах мышей линии C57BL/6J. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Содержание и тестирование животных проводили в соответствии с инструкцией по содержанию и использованию лабораторных животных (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications, 2010).

Плазмида. Плазмиды, несущие под контролем синапсинового промотора гены Tau[R406W] и EGFP (enhanced green fluorescent protein) или только EGFP, получены от профессора Е.Г. Понимаскина (Hannover Medical School, Ганновер, Германия).

Трансфекция клеток. Упаковку плазмид pAAV_SynH1-2_Tau[R406W]-EGFP и pAAV_SynH1-2_EGFP в аденоассоциированные вирусные (AAV) капсиды выполняли путем котрансфекции плазмидами AAV-DJ и pHelper (Cell Biolabs, Inc., США) в клетки HEK293FT, которые инкубировали по протоколу, описанному ранее (Kondaurova et al., 2021). Вирусные частицы собирали через 48 ч в соответствии с протоколом из работы D. Grimm с коллегами (2003). Количество полученных вирусных частиц определяли при проведении количественного ПЦР-анализа в реальном времени и разводили до концентрации 10^9 вирусных частиц/мкл.

Стереотаксическая инъекция. Перед проведением процедуры животных наркотизировали смесью 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бутанола, помещали в стереотаксическую установку (TSE Systems, Германия). В черепе были просверлены два отверстия согласно координатам: AP: +1.5 мм, LR: ±1 мм, DV: 1 мм (http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=1.5&ap=-2&dv=2). Мышам обеих групп (по 36 самцов AAV-Tau[R406W] и AAV-EGFP) производили двустороннее введение вирусного конструкта AAV-Tau[R406W]-EGFP или AAV-EGFP в префронтальную кору. После инъекций разрез зашивали прерывистым швом, животное помещали в теплую клетку (Kondaurova et al., 2021).

Фармакологическое воздействие. Через семь дней после введения AAV каждую из групп разделили на три подгруппы по 12 мышей. Эффект хронического введения амисульприда (Sanofi-Aventis France, Франция) оценивали после 4 недель внутрибрюшинного введения препарата в дозах 3 и 10 мг/кг для первой и второй подгруппы соответственно в объеме 10 мкл/г. Животным третьей подгруппы вводили физиологический раствор в том же объеме. За два дня до проведения экспериментов мышей рассаживали по индивидуальным клеткам для снятия группового эффекта.

Тест «открытое поле». Для теста «открытое поле» использовали круглую арену, освещенную через матовый полупрозрачный пол двумя 12 Вт галогеновыми лампами, расположенными на 40 см ниже пола арены (Kulikov et al., 2008). Мышь помещали рядом со стеной, после чего поведение животного регистрировали в течение 5 мин с помощью камеры, расположенной на расстоянии 80 см от арены. Арену обрабатывали 70 % спиртом после каждого теста. Видеопоток с камеры был проанализирован покадрово с помощью оригинального программного обеспечения EthoStudio (Khotskin et al., 2019). Автоматически измеряли длину пути (горизонтальная активность).

Тест на кратковременную память (recency test) делали в рамках парадигмы теста «открытое поле». На первом этапе этого теста животным предъявляли два одинаковых объекта (пластиковые кубики размером 5 × 5 см – старый объект), расположенных в центре арены на расстоянии 8–10 см друг от друга и 10 см от стенок арены. Животных тестировали в течение 10 мин. Через 90 мин после первого теста животным предъявляли два других объекта (пластиковые стаканчики диаметром 4 см и высотой 5 см – новый объект), расположенных в центре арены на расстоянии 8–10 см друг от друга и 10 см от стенок арены. Животных тестировали в течение 10 мин. Через 90 мин после второго этапа один из предъявленных объектов заменяли на первый объект (пластиковые кубики размером 5 × 5 см). Животных тестировали в течение 10 мин.

Оценивали время подходов к новому и к старому объекту. Затем высчитывали дискриминацию по формуле (время у нового объекта – время у старого объекта)/суммарное время у обоих объектов.

Диссекция образцов мозга. После проведения поведенческих тестов через 48 ч животных выводили из эксперимента посредством декапитации. Сразу же после эвтаназии проводили извлечение мозга и помещение необходимых структур (префронтальная кора, гиппокамп) в пробирки в жидкий азот. До дальнейших процедур структуры хранили в низкотемпературном холодильнике при температуре –80 °C.

Флуоресцентная микроскопия. Через 6 недель после инъекции AAV в префронтальную кору мышам (по одной-две мыши из каждой группы) под анестезией выполняли транскардиальную перфузию 20 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и 20 мл 4 % раствора параформальдегида. Головной мозг извлекали и затем фиксировали 4 % параформальдегидом в течение 16 ч и погружали в 30 % сахарозу в PBS на два дня. Последовательные срезы размером 12 мкм делали с помощью криотома (Thermo Scientific, Германия). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензимида (краситель Hoechst 33258, 5 мкг/мл в PBS (Sigma-Aldrich, Германия). Затем срезы монтировали под покровное стекло, используя среду Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, США). Полученные срезы исследовали с помощью конфокального микроскопа Olympus IX83P2ZF.

Выделение РНК. Структуру мозга гомогенизировали в 300 мкл TRIzol Reagent (Life Technologies, США) по протоколу производителя. Полученный осадок РНК растворяли в 24.5 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК). Для устранения возможных примесей геномной ДНК добавляли 0.5 мкл ДНКазы (RNase free DNase, Promega, США, 1000 о. е./мл), затем пробы инкубировали 15 мин при 37 °C и после этого 10 мин – при 65 °C. Определяли концентрации РНК с помощью спектрофотометра Nanodrop2000c (Thermo Fisher Scientific), после чего доводили до 125 нг/мкл. Хранили РНК при –80 °C.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессию генов определяли с применением количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории (Kulikov et al., 2005; Науменко, Куликов, 2006; Naumenko et al., 2008). Использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (гены домашнего хозяйства: *Polr2a* – ген РНК-полимеразы II и *B2m* – ген β2-микроглобулина) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчета уровня мРНК исследуемых генов. Внешним стандартом служила ДНК мыши известной концентрации, что позволило контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов в образцах. Для определения уровня мРНК мы использовали отношение количества кДНК исследуемых генов к среднему геометрическому уровню кДНК генов *Polr2a* и *B2m*.

Праймеры для амплификации кДНК были подобраны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «Биоссет» (Новосибирск, Россия). ПЦР была проведена на амплификаторе Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 95 °C; 40 циклов с тремя этапами: 10 с при 95 °C, 30 с при температуре отжига праймера, 20 с при 72 °C (Приложение 1)[1].

Статистический анализ. Статистический анализ выполняли в программе GraphPadPrism 9.1.0. Для поиска выбросов в выборках применяли метод ROUT (Q = 0.05), найденные значения исключали из дальнейшего анализа. Нормальное распределение выборок проверяли с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Согласно этим критериям, все данные подчинялись закону нормального распределения. Для выявления различий между группами проводили двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с апостериорным множественным сравнением по Фишеру. Результаты были представлены как m ± SEM (m – среднее; SEM – стандартная ошибка среднего). Статистически значимым различие считалось при $p < 0.05$.

Результаты

Для проверки правильности введения конструктов использовали флуоресцентную микроскопию срезов мозга мыши. Срезы мозга в районе префронтальной коры продемонстрировали свечение при возбуждении светом длиной волны 488 нм с эмиссией на 510 нм, что подтверждает введение вирусного конструкта в нужную структуру мозга (рис. 1).

По наличию продукта гена *MAPT* (в среднем на 28-м цикле ПЦР) мы подтвердили экспрессию гена в префронтальной коре мышей, которым ввели конструкт AAV-Tau[R406W], в то время как у контрольных мышей (AAV-EGFP) не наблюдалась транскрипция этого гена (рис. 2).

В тесте «открытое поле» на двигательную активность мышей оказали влияние как введение конструкта ($F_{1.57}$ = = 3.598, $p = 0.063$), так и введение амисульприда ($F_{2.57}$ = = 4.580, $p = 0.014$), а также взаимодействие этих факторов ($F_{2.57} = 3.520$, $p = 0.036$). AAV-EGFP животные проявляли повышенную двигательную активность не только по сравнению с AAV-Tau[R406W] мышами ($p = 0.012$), но и относительно AAV-EGFP мышей, подвергавшихся действию амисульприда в дозе как 3 мг/кг ($p = 0.003$), так и 10 мг/кг ($p = 0.013$) (рис. 3).

Значения индекса дискриминации в “recency test” ни по фактору введения амисульприда ($F_{2.26} = 1.8$, $p > 0.05$), ни по фактору введения AAV ($F_{1.26} = 1.111$, $p > 0.05$) и их взаимодействию ($F_{2.26} = 1.6$, $p > 0.05$) не показали статистически значимых различий (рис. 4).

Были найдены значимые различия в уровне мРНК гена *Htr7* по взаимодействию факторов в префронтальной коре ($F_{2.44} = 7.059$, $p = 0.002$). Введение конструкта AAV-Tau[R406W] вызвало увеличение транскрипции гена *Htr7* ($p = 0.020$). Мы отмечали снижение уровня мРНК гена *Htr7* до нормы у группы мышей AAV-Tau[R406W], которым вводили амисульприд 10 мг/кг в коре ($p = 0.014$)

[1] Приложения 1 и 2 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx15.pdf

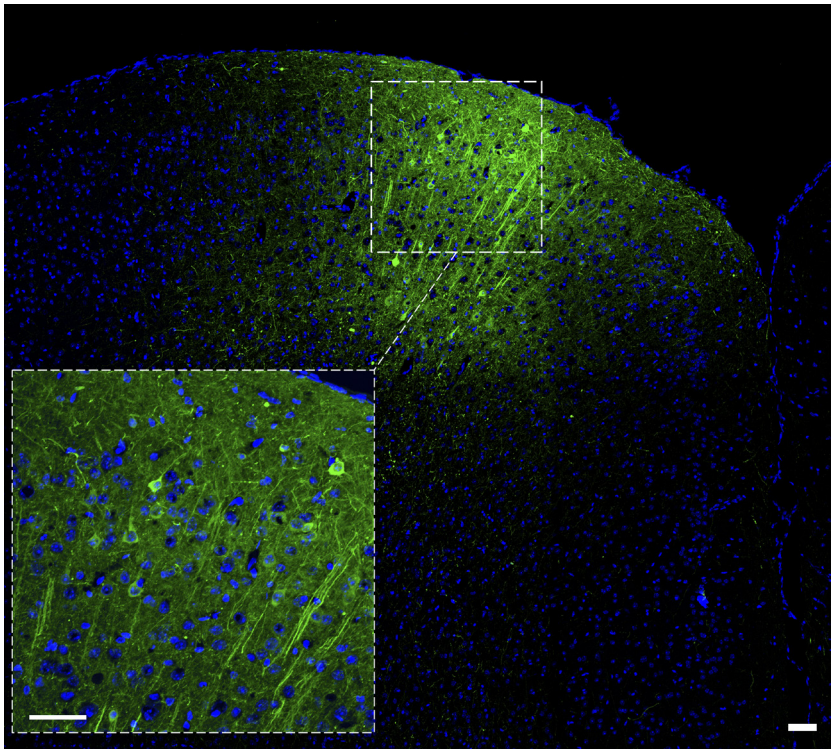


Рис. 1. Микрофотографии среза префронтальной коры мозга мыши, демонстрирующие успешную AAV-опосредованную трансфекцию клеток, на которую указывает экспрессия EGFP (enhanced green fluorescent protein).

Шкала 50 мкм.

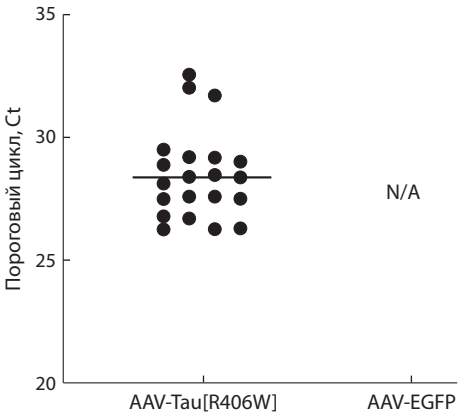


Рис. 2. Экспрессия (Ct) гена *MAPT* в префронтальной коре у мышей со сверхэкспрессией Tau[R406W].

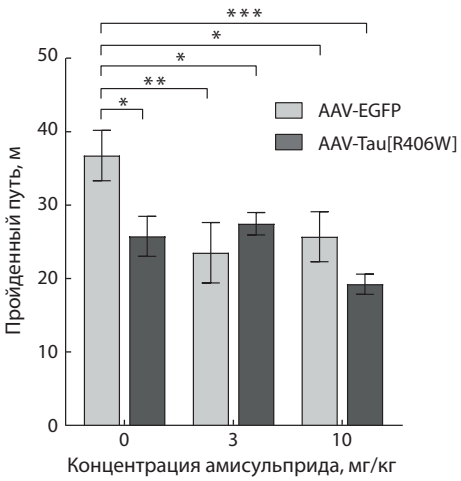


Рис. 3. Изменение двигательной активности мышей в тесте «открытое поле».

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

(рис. 5, *а*). Введение амисульприда с концентрацией 3 мг/кг не показало подобного эффекта ($p = 0.157$). Интересно, что при введении препарата в дозе 10 мг/кг мышам группы AAV-EGFP наблюдалось увеличение уровня мРНК *Htr7* ($p = 0.004$) (см. рис. 5, *а*).

Для гена *Htr1a* в префронтальной коре (см. рис. 5, *б*) показаны аналогичные различия: наличие взаимодействия факторов ($F_{2.52} = 3.359$, $p = 0.043$) (Приложение 2), снижение транскрипции гена рецептора при введении 10 мг/кг амисульприда мышам AAV-Tau[R406W] группы ($p = 0.005$) и увеличение уровня мРНК при введении препарата в дозе 10 мг/кг у AAV-EGFP мышей ($p = 0.044$).

При анализе уровня мРНК гена *Cdk5* в префронтальной коре было выявлено взаимодействие факторов ($F_{2.48} = 7.182$, $p = 0.002$) (см. Приложение 2). Мы обнаружили, что уровень мРНК гена *Cdk5* AAV-Tau[R406W] группы, которая не подвергалась действию амисульприда, повышен относительно AAV-EGFP группы ($p = 0.021$), в то время как действие амисульприда в дозе 10 мг/кг привело к уменьшению транскрипции ($p = 0.004$) по сравнению с AAV-EGFP группой. Кроме того, транскрипция гена *Cdk5* увеличилась при действии амисульприда в концентрации 10 мг/кг на мышах AAV-EGFP по сравнению с AAV-EGFP животными, которым вводили физиологический раствор ($p = 0.001$) (рис. 6).

Мы исследовали влияние амисульприда на уровень мРНК нейротрофического фактора головного мозга *Bdnf* и его рецепторов *Ntrk2* (кодирует рецептор TrkB) и *Ngfr* (кодирует рецептор $p75^{NTR}$). В префронтальной коре для мРНК *Bdnf* наблюдалось влияние факторов введения конструкта, введения препарата и их взаимодействие, а для *Ntrk2* – влияние факторов введения конструкта и взаимодействие факторов (см. Приложение 2). Уровень мРНК *Bdnf* ($p < 0.001$) и *Ntrk2* ($p < 0.001$) снизился при сверхэкспрессии мутантного тау-белка по сравнению с AAV-EGFP мышами, которым вводили физиологический раствор.

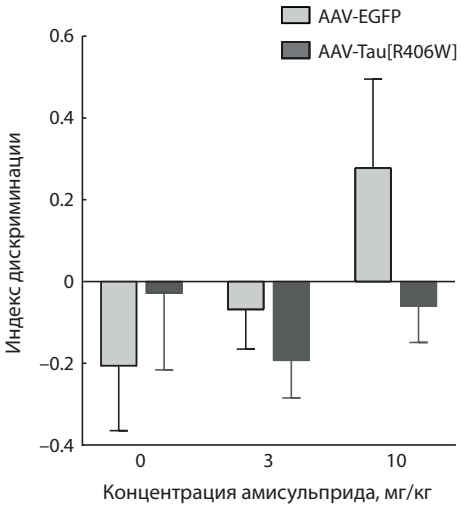


Рис. 4. Влияние амисульприда на индекс дискриминации в тесте "recency test".

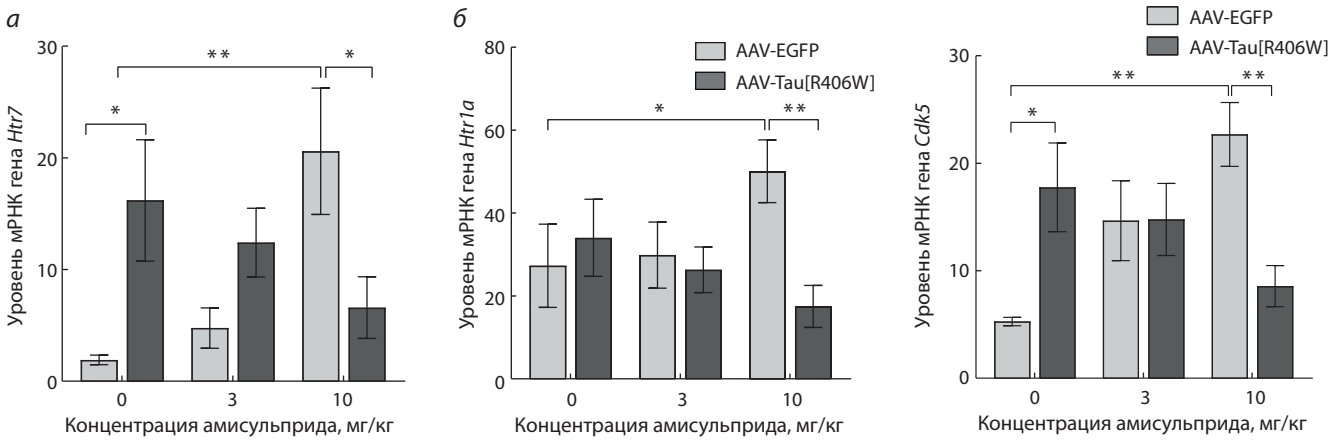


Рис. 5. Влияние амисульприда на транскрипцию генов *Htr7* (*а*) и *Htr1a* (*б*) в префронтальной коре мышей со сверхэкспрессией Tau[R406W].

Значения нормированы на среднее геометрическое мРНК генов *Polr2a* и *B2m*.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Рис. 6. Влияние амисульприда на транскрипцию гена *Cdk5* в префронтальной коре мышей со сверхэкспрессией тау-белка [R406W].

Значения нормированы на среднее геометрическое мРНК генов *Polr2a* и *B2m*.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

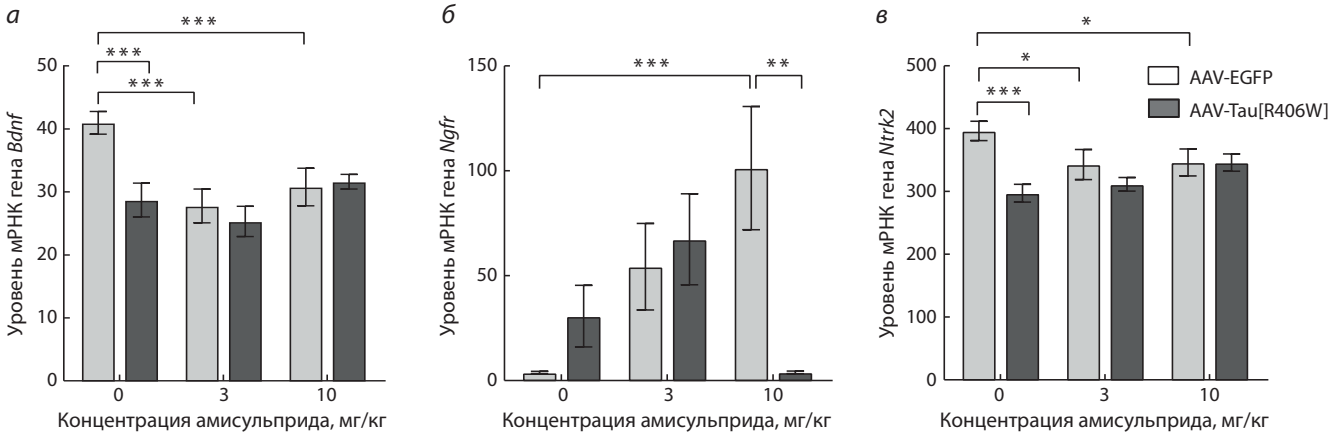


Рис. 7. Влияние амисульприда на транскрипцию генов *Bdnf* (*а*), *Ngfr* (*б*) и *Ntrk2* (*в*) в префронтальной коре мышей со сверхэкспрессией Tau[R406W].

Значения нормированы на среднее геометрическое мРНК генов *Polr2a* и *B2m*.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Кроме этого, отмечено снижение уровня мРНК *Bdnf* ($p < 0.001$) и *Ntrk2* ($p = 0.037$) при действии препарата в дозе 3 мг/кг у AAV-EGFP мышей, а также при введении препарата в дозе 10 мг/кг AAV-EGFP мышам для *Bdnf* ($p = 0.004$) и *Ntrk2* ($p = 0.045$) (рис. 7, *а*, *в*). При этом на уровень мРНК гена *Ngfr* в префронтальной коре наблюдается влияние взаимодействия факторов ($F_{2.43} = 4.752$, $p = 0.014$) (см. Приложение 2). Уровень транскрипции гена *Ngfr* в коре AAV-EGFP мышей повышается в несколько раз при введении амисульприда в концентрации 10 мг/кг ($p = 0.002$), однако мыши со сверхэкспрессией Tau[R406W] показали снижение уровня мРНК этого гена при воздействии той же дозы ($p = 0.002$) (см. рис.7, *б*).

Статистически значимых различий по исследуемым генам в гиппокампе не обнаружено. В Приложении 2 представлены данные двухфакторного дисперсионного анализа по влиянию факторов введения конструкта, введения препарата и их взаимодействие.

Обсуждение

Исследование поведения животных в настоящей работе показало, что двигательная активность в тесте «открытое поле» снижена как у группы AAV-Tau[R406W] с физиологическим раствором, так и у групп, которым вводили амисульприд в разных дозах по сравнению с группой AAV-EGFP, получавшей физиологический раствор. Результаты теста совпадают с данными работы K. Jahreis с коллегами, в которой показано, что введение вектора с Tau[R406W] и лечение амисульпридом (1 мг/кг, 16 дней) снижает двигательную активность в тесте «открытое поле» по сравнению с контролем (Jahreis et al., 2023).

В нашей работе амисульприд не оказал существенного эффекта на кратковременную память животных с AAV-Tau[R406W], в отличие от исследования K. Jahreis с коллегами, которые показали повышение индекса дискриминации у мышей с AAV-Tau[R406W] и амисульпридом (Jahreis et al., 2023). В нашем эксперименте отсутствие

существенного влияния амисульприда на краткосрочную память, возможно, связано с тем, что период восстановления после введения вектора и начала терапии амисульпридом был семь дней, в отличие от работы K. Jahreis с коллегами, в которой период восстановления был три недели. Таким образом, вероятно, что для коррекции когнитивных способностей амисульпридом важно принимать во внимание стадию развития таупатии.

Мы обнаружили, что введение AAV-Tau[R406W] приводит к повышению уровня мРНК генов *Htr7* и *Cdk5* в префронтальной коре по сравнению с контрольными животными. Эти результаты, возможно, связаны с ответной реакцией, сопровождающейся запуском нейропротективных механизмов, в том числе с повышением уровня 5-HT7R, как известно, вовлеченного в регуляцию морфологии нейронов, рост нейритов, дендритных шипиков и синаптогенез (Kobe et al., 2012). Однако недавно было показано (Solas et al., 2021), что в посмертных образцах мозга больных БА уровень мРНК гена *Htr7* снижен в передней префронтальной коре. Такой результат можно объяснить продолжительными нейродегенеративными процессами в мозге больных, в то время как в нашей работе воздействие конструкта с мутантным тау-белком составляло всего шесть недель.

Полученные нами результаты о повышенной транскрипции *Cdk5* у мышей с тау-патологией согласуются с работой (Labus et al., 2021), где показано, что именно CDK5 отвечает за патологическое влияние 5-HT7R на гиперфосфорилирование тау-белка. При этом совместное снижение уровня мРНК как *Htr7*, так и *Cdk5* у мышей AAV-Tau[R406W], получавших амисульприд, до значений, статистически не отличающихся от значений контрольных животных, также подтверждает предложенный механизм действия обратных агонистов 5-HT7R в восстановлении нормальной функции тау-белка *in vivo*. Увеличение уровня мРНК *Htr7*, *Htr1a* и *Cdk5* после введения амисульприда в дозе 10 мг/кг AAV-EGFP мышам, вероятно, является компенсаторным ответом на ингибирование 5-HT_7-рецептора амисульпридом. Результаты по влиянию амисульприда на уровень мРНК *Cdk5* хорошо согласуются с данными, полученными на крысах линии OXYS: у еще здоровых одномесячных крыс амисульприд также повышал уровень мРНК *Cdk5* в коре (Molobekova et al., 2023).

Известно, что 5-HT_{1A}-рецепторы (5-HT1AR) и 5-HT7R могут образовывать гетеродимеры *in vitro* и *in vivo*, причем гетеродимеризация приводит к опосредованной агонистами интернализации 5-HT_{1A}-рецепторов (Renner et al., 2012). Хроническая активация 5-HT7R вызывает десенсибилизацию этих рецепторов, а также понижает содержание и функциональную активность 5-HT_{1A}-рецепторов во фронтальной коре, не влияя при этом на содержание 5-HT7R (Кондаурова и др., 2017). Показано также, что сверхэкспрессия 5-HT7R в среднем мозге приводит к изменениям экспрессии гена 5-HT1AR в зависимости от линии мышей, которой вводили вектор. У мышей инбредной линии C57Bl/6J было обнаружено снижение уровня мРНК гена 5-HT1AR во фронтальной коре, тогда как у мышей ASC (antidepressant sensitive cataleptics) экспрессия этого гена была снижена в гиппокампе (Rodnyy et al., 2022). Амисульприд же является обратным агонистом 5-HT_7-рецепторов, подавляет его конститутивную активность и, возможно, таким образом, может влиять на уровни мРНК самого гена по типу отрицательной обратной связи. Интересно отметить, что хроническое введение амисульприда в дозе 10 мг/кг привело к повышению экспрессии не только гена 5-HT7R, но и гена 5-HT1AR, что может быть связано со взаимной регуляцией этих рецепторов посредством их гетеродимеризации.

BDNF – один из самых изученных нейротрофических факторов. Он играет жизненно важную роль в процессах роста и созревания клеток мозга на всех стадиях развития, а также регулирования синаптической передачи и пластичности во взрослом возрасте (Edelmann et al., 2015). В контексте БА истощение BDNF связано с фосфорилированием и агрегацией тау-белка, накоплением Aβ, нейровоспалением и гибелью нейронов (Pisani et al., 2023). Стимуляция BDNF приводит к дефосфорилированию тау-белка за счет активации передачи сигналов TrkB и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) (Elliott et al., 2005).

В этой работе мы обнаружили снижение уровня мРНК генов BDNF и его рецептора TrkB в коре после введения вектора AAV-Tau[R406W]. Эти данные хорошо соотносятся с тем, что при БА происходит снижение уровня BDNF (Song et al., 2015). Кроме того, мы показали, что введение амисульприда в разных дозах также снижает уровни мРНК этих генов как у AAV-EGFP мышей, так и у мышей с AAV-Tau[R406W]. Эти результаты противоречат ранее полученным данным о том, что амисульприд повышает уровень BDNF в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y (Park et al., 2011). Тем не менее существуют данные о том, что амисульприд не влияет на уровень мРНК *Bdnf* в другой клеточной модели – в клетках глиомы T98G (Jóźwiak-Bębenista et al., 2017). В исследовании E.N. Rizos с коллегами также не обнаружено влияния амисульприда на уровень BDNF в сыворотке крови пациентов с шизофренией (Rizos et al., 2010). При этом было выявлено увеличение экспрессии и фосфорилирования TrkB через 30 мин после активации 5-HT7R (Samarajeewa et al., 2014).

С одной стороны, можно предположить, что механизмы действия амисульприда *in vitro* и *in vivo* различаются. Но, с другой стороны, показано, что в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y удлинение нервных волокон, вызванное инкубированием с 5-HT, фактором роста нервов (NGF) или нейротрофическим фактором головного мозга BDNF, блокируется антагонистами 5-HT7R, а выключение гена *Htr7* также снижает длину нервных волокон. Активация же 5-HT7R агонистами повышает экспрессию генов NGF и BDNF (Chang et al., 2022).

В недавней работе L.L. Shen с коллегами показано, что нокаут $p75^{NTR}$ приводит к снижению Aβ-индуцированного гиперфосфорилирования тау-белка и нейродегенерации как у здоровых мышей, так и в мышиной модели человеческой таупатии с участием киназ CDK5 и GSK3β (Shen et al., 2019). Эти данные позволяют предположить, что $p75^{NTR}$ по крайней мере частично опосредует тау-патологию, запускаемую Aβ-пептидом. Однако в нашей работе сверхэкспрессия Tau[R406W] не оказала достоверного влияния на уровень мРНК $p75^{NTR}$-рецептора. При этом мы обнаружили, что амисульприд в несколько раз повышает транскрипцию гена рецептора $p75^{NTR}$ у AAV-EGFP

мышей. В литературе также имеются данные о негативном влиянии длительного введения амисульприда посредством снижения холин-ацетилтрансферазы (ChAT). В работе G.B. Huang с коллегами продемонстрировано, что длительное применение амисульприда (в течение 45 дней) приводит к снижению количества ChAT-положительных клеток в префронтальной коре, но не в гиппокампе крыс, и, таким образом, может оказывать негативное воздействие на когнитивные функции (Huang et al., 2012).

Заключение

Применение амисульприда при сверхэкспрессии Tau[R406W] привело к снижению уровня мРНК генов *Htr7* и *Cdk5* в префронтальной коре, что позволяет рассматривать этот препарат в качестве агента для восстановления нормальной функции тау-белка. Однако введение препарата мышам без таупатии вызвало уменьшение уровня мРНК генов *Bdnf* и *Ntrk2* в коре. При этом уровень мРНК *Htr7*, *Htr1a* и *Cdk5* повысился у AAV-EGFP мышей, которым вводили амисульприд. Эти изменения, вероятно, отражают негативный эффект хронического введения амисульприда, что косвенно подтверждается увеличением экспрессии гена $p75^{NTR}$-рецептора, одной из функций которого является запуск апоптотических процессов.

Список литературы / References

Еремин Д.В., Кондаурова Е.М., Родный А.Я., Молобекова К.А., Кудлай Д.А., Науменко В.С. Серотониновые рецепторы – потенциальная мишень для лечения болезни Альцгеймера. *Биохимия*. 2023;88(12):2399-2421. DOI 10.31857/S0320972523120059
[Eremin D.V., Kondaurova E.M., Rodny A.Ya., Molobekova K.A., Kudlay D.A., Naumenko V.S. Serotonin receptors – a potential target for the treatment of Alzheimer's disease. *Biokhimiya = Biochemistry*. 2023;88(12):2399-2421. DOI 10.31857/S0320972523120059 (in Russian)]

Кондаурова Е.М., Базовкина Д.В., Науменко В.С. Взаимодействие 5-HT_{1A}- и 5-HT_7-рецепторов: хроническая активация 5-HT_7-рецептора уменьшает содержание 5-HT_{1A}-рецептора и понижает его функциональную активность в мозге мышей. *Молекуляр. биология*. 2017;51(1):157-165. DOI 10.7868/S0026898416060100
[Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Naumenko V.S. 5-HT_{1A}/5-HT_7 receptor interplay: Chronic activation of 5-HT_7 receptors decreases the functional activity of 5-HT_{1A} receptor and its content in the mouse brain. *Molecular Biology*. 2017;51(1):136-142. DOI 10.1134/S0026893316060108]

Науменко В.С., Куликов А.В. Количественное определение экспрессии гена 5-HT_{1A} серотонинового рецептора в головном мозге. *Молекуляр. биология*. 2006;40(1):37-44
[Naumenko V.S., Kulikov A.V. Quantitative assay of 5-HT_{1A} receptor gene expression in the brain. *Molecular Biology*. 2006;40(1):30-36. DOI 10.1134/S0026893306010067]

Arendt D.H., Smith J.P., Bastida C.C., Prasad M.S., Oliver K.D., Eyster K.M., Summers T.R., Delville Y., Summers C.H. Contrasting hippocampal and amygdalar expression of genes related to neural plasticity during escape from social aggression. *Physiol. Behav*. 2012;107(5):670-679. DOI 10.1016/j.physbeh.2012.03.005

Bettens K., Sleegers K., Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19(R1):R4-R11. DOI 10.1093/hmg/ddq142

Chang W.Y., Yang Y.T., She M.P., Tu C.H., Lee T.C., Wu M.S., Sun C.H., Hsin L.W., Yu L.C. 5-HT(7) receptor-dependent intestinal neurite outgrowth contributes to visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Lab. Invest.* 2022;102(9):1023-1037. DOI 10.1038/s41374-022-00800-z

Edelmann E., Cepeda-Prado E., Franck M., Lichtenecker P., Brigadski T., Lessmann V. Theta burst firing recruits BDNF release and signaling in postsynaptic CA1 neurons in spike-timing-dependent LTP. *Neuron*. 2015;86(4):1041-1054. DOI 10.1016/j.neuron.2015.04.007

Elliott E., Atlas R., Lange A., Ginzburg I. Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3Kinase signalling mechanism. *Eur. J. Neurosci*. 2005;22(5):1081-1089. DOI 10.1111/j.1460-9568.2005.04290.x

Gossye H., Van Mossevelde S., Sieben A., Bjerke M., Hendrickx Van de Craen E., van der Zee J., De Deyn P.P., De Bleecker J., Versijpt J., van den Ende J., Deryck O., Bourgeois P., Bier J.C., Goethals M., Vandenberghe R., Engelborghs S., Van Broeckhoven C. Patients carrying the mutation p.R406W in *MAPT* present with non-conforming phenotypic spectrum. *Brain*. 2023;146(4):1624-1636. DOI 10.1093/brain/awac362

Grimm D., Kay M.A., Kleinschmidt J.A. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol. Ther*. 2003;7(6):839-850. DOI 10.1016/s1525-0016(03)00095-9

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder L.I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83(13):4913-4917. DOI 10.1073/pnas.83.13.4913

Hock C., Heese K., Hulette C., Rosenberg C., Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch. Neurol*. 2000;57(6):846-851. DOI 10.1001/archneur.57.6.846

Huang G.B., Zhao T., Li C.R., Sui Z.Y., Kang N.I., Han E.H., Chung Y.C. Choline acetyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus after acute and chronic exposure to amisulpride, haloperidol, and risperidone. *Neurosci. Lett*. 2012;528(2):131-136. DOI 10.1016/j.neulet.2012.09.024

Huey E.D., Putnam K.T., Grafman J. A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia. *Neurology*. 2006;66(1):17-22. DOI 10.1212/01.wnl.0000191304.55196.4d

Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., … Oostra B.A., Hardy J., Goate A., van Swieten J., Mann D., Lynch T., Heutink P. Association of missense and 5′-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393(6686):702-705. DOI 10.1038/31508

Jahreis K., Brüge A., Borsdorf S., Müller F.E., Sun W., Jia S., Kang D.M., Boesen N., Shin S., Lim S., Koroleva A., Satala G., Bojarski A.J., Rakuša E., Fink A., Doblhammer-Reiter G., Kim Y.K., Dityatev A., Ponimaskin E., Labus J. Amisulpride as a potential disease-modifying drug in the treatment of tauopathies. *Alzheimers Dement*. 2023;19(12):5482-5497. DOI 10.1002/alz.13090

Jóźwiak-Bębenista M., Jasinska-Stroschein M., Kowalczyk E. The differential effects of neuroleptic drugs and PACAP on the expression of BDNF mRNA and protein in a human glioblastoma cell line. *Acta Neurobiol. Exp*. 2017;77(3):205-213

Khotskin N.V., Plyusnina A.V., Kulikova E.A., Bazhenova E.Y., Fursenko D.V., Sorokin I.E., Kolotygin I., Mormede P., Terenina E.E., Shevelev O.B., Kulikov A.V. On association of the lethal yellow (A^Y) mutation in the *agouti* gene with the alterations in mouse brain and behavior. *Behav. Brain Res*. 2019;359:446-456. DOI 10.1016/j.bbr.2018.11.013

Kobe F., Guseva D., Jensen T.P., Wirth A., Renner U., Hess D., Muller M., Medrihan L., Zhang W., Zhang M., Braun K., Westerholz S., Herzog A., Radyushkin K., El-Kordi A., Ehrenreich H., Richter D.W., Rusakov D.A., Ponimaskin E. $5\text{-HT}_7\text{R/G}_{12}$ signaling regulates neuronal morphology and function in an age-depen-

dent manner. *J. Neurosci*. 2012;32(9):2915-2930. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2765-11.2012

Kondaurova E.M., Plyusnina A.V., Ilchibaeva T.V., Eremin D.V., Rodnyy A.Y., Grygoreva Y.D., Naumenko V.S. Effects of a *Cc2d1a/Freud-1 Knockdown* in the hippocampus on behavior, the serotonin system, and BDNF. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(24):13319. DOI 10.3390/ijms222413319

Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J. Neurosci. Methods*. 2005;141(1):97-101. DOI 10.1016/j.jneumeth.2004.06.005

Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. *J. Neurosci. Methods*. 2008;170(2):345-351. DOI 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024

Labus J., Röhrs K.F., Ackmann J., Varbanov H., Müller F.E., Jia S., Jahreis K., Vollbrecht A.L., Butzlaff M., Schill Y., Guseva D., Böhm K., Kaushik R., Bijata M., Marin P., Chaumont-Dubel S., Zeug A., Dityatev A., Ponimaskin E. Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT7 receptor. *Prog. Neurobiol*. 2021;197:101900. DOI 10.1016/j.pneurobio.2020.101900

Minaya M.A., Mahali S., Iyer A.K., Eteleeb A.M., Martinez R., Huang G., Budde J., Temple S., Nana A.L., Seeley W.W., Spina S., Grinberg L.T., Harari O., Karch C.M. Conserved gene signatures shared among *MAPT* mutations reveal defects in calcium signaling. *Front. Mol. Biosci*. 2023;10:1051494. DOI 10.3389/fmolb.2023.1051494

Molobekova C.A., Kondaurova E.M., Ilchibaeva T.V., Rodnyy A.Y., Stefanova N.A., Kolosova N.G., Naumenko V.S. Amisulpride decreases tau protein hyperphosphorylation in the brain of OXYS rats. *Curr. Alzheimer Res*. 2023;20(7):496-505. DOI 10.2174/1567205020666230828144651

Murley A.G., Rowe J.B. Neurotransmitter deficits from frontotemporal lobar degeneration. *Brain*. 2018;141(5):1263-1285. DOI 10.1093/brain/awx327

Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. *J. Neurosci. Methods*. 2008;170(2):197-203. DOI 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008

Park S.W., Seo M.K., Cho H.Y., Lee J.G., Lee B.J., Seol W., Kim Y.H. Differential effects of amisulpride and haloperidol on dopamine D2 receptor-mediated signaling in SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology*. 2011;61(4):761-769. DOI 10.1016/j.neuropharm.2011.05.022

Perez M., Lim F., Arrasate M., Avila J. The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J. Neurochem*. 2000;74(6):2583-2589. DOI 10.1046/j.1471-4159.2000.0742583.x

Pisani A., Paciello F., Del Vecchio V., Malesci R., De Corso E., Cantone E., Fetoni A.R. The role of BDNF as a biomarker in cognitive and sensory neurodegeneration. *J. Pers. Med*. 2023;13(4):652. DOI 10.3390/jpm13040652

Popova N.K., Naumenko V.S. Neuronal and behavioral plasticity: the role of serotonin and BDNF systems tandem. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2019;23(3):227-239. DOI 10.1080/14728222.2019.1572747

Renner U., Zeug A., Woehler A., Niebert M., Dityatev A., Dityateva G., Gorinski N., Guseva D., Abdel-Galil D., Frohlich M., Doring F., Wischmeyer E., Richter D.W., Neher E., Ponimaskin E.G. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT_7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J. Cell Sci*. 2012;125(Pt. 10):2486-2499. DOI 10.1242/jcs.101337

Rizos E.N., Papadopoulou A., Laskos E., Michalopoulou P.G., Kastania A., Vasilopoulos D., Katsafouros K., Lykouras L. Reduced serum BDNF levels in patients with chronic schizophrenic disorder in relapse, who were treated with typical or atypical antipsychotics. *World J. Biol. Psychiatry*. 2010;11(2-2):251-255. DOI 10.3109/15622970802182733

Rodnyy A.Y., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Ilchibaeva T.V., Kovetskaya A.I., Baraboshkina I.A., Bazhenova E.Y., Popova N.K., Naumenko V.S. Serotonin 5-HT7 receptor overexpression in the raphe nuclei area produces antidepressive effect and affects brain serotonin system in male mice. *J. Neurosci. Res*. 2022;100(7):1506-1523. DOI 10.1002/jnr.25055

Rovelet-Lecrux A., Lecourtois M., Thomas-Anterion C., Le Ber I., Brice A., Frebourg T., Hannequin D., Campion D. Partial deletion of the *MAPT* gene: a novel mechanism of FTDP-17. *Hum. Mutat.* 2009;30(4):E591-E602. DOI 10.1002/humu.20979

Samarajeewa A., Goldemann L., Vasefi M.S., Ahmed N., Gondora N., Khanderia C., Mielke J.G., Beazely M.A. 5-HT7 receptor activation promotes an increase in TrkB receptor expression and phosphorylation. *Front. Behav. Neurosci*. 2014;8:391. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00391

Shen L.L., Li W.W., Xu Y.L., Gao S.H., Xu M.Y., Bu X.L., Liu Y.H., Wang J., Zhu J., Zeng F., Yao X.Q., Gao C.Y., Xu Z.Q., Zhou X.F., Wang Y.J. Neurotrophin receptor p75 mediates amyloid β-induced tau pathology. *Neurobiol. Dis*. 2019;132:104567. DOI 10.1016/j.nbd.2019.104567

Solas M., Van Dam D., Janssens J., Ocariz U., Vermeiren Y., De Deyn P.P., Ramirez M.J. 5-HT_7 receptors in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int*. 2021;150:105185. DOI 10.1016/j.neuint.2021. 105185

Song J.H., Yu J.T., Tan L. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease: risk, mechanisms, and therapy. *Mol. Neurobiol*. 2015;52(3):1477-1493. DOI 10.1007/s12035-014-8958-4

Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korbolina E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. *Oncotarget*. 2015;6(3):1396-1413. DOI 10.18632/oncotarget.2751

Strang K.H., Golde T.E., Giasson B.I. *MAPT* mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Lab. Invest*. 2019;99(7):912-928. DOI 10.1038/s41374-019-0197-x

Xia Y., Sorrentino Z.A., Kim J.D., Strang K.H., Riffe C.J., Giasson B.I. Impaired tau-microtubule interactions are prevalent among pathogenic tau variants arising from missense mutations. *J. Biol. Chem*. 2019;294(48):18488-18503. DOI 10.1074/jbc.RA119.010178

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.02.2024. После доработки 26.03.2024. Принята к публикации 28.03.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):407-415

DOI 10.18699/vjgb-24-46

Паттерны экспрессии рецепторов дофамина и основных элементов нейротрофических (BDNF, CDNF) систем в критические периоды онтогенеза в структурах мозга мышей с аутизм-подобным поведением (BTBR) или его отсутствием (C57BL/6 J)

П.Д. Правикова, М.А. Арссан, Е.А. Заливина, Е.М. Кондаурова, Е.А. Куликова, И.И. Белокопытова, В.С. Науменко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
PollyPravi@yandex.ru

Аннотация. Анализ механизмов расстройства аутистического спектра (РАС) является актуальной задачей в связи с широкой и постоянно растущей распространенностью этого состояния. Исследование критических периодов нейроонтогенеза представляет интерес, поскольку манифестацию РАС нередко связывают с внутриутробными нарушениями развития головного мозга. Одна из перспективных на сегодняшний день гипотез постулирует связь патогенеза РАС с дисфункцией нейротрансмиттерных и нейротрофических систем. В настоящей работе исследована экспрессия генов ключевых рецепторов дофамина (*Drd1*, *Drd2*), нейротрофического фактора мозга (*Bdnf*), его рецепторов (*Ntrkb2*, *Ngfr*) и опосредующего действие BDNF транскрипционного фактора *Creb1*, а также дофаминового нейротрофического фактора (*Cdnf*) в периоды эмбриогенеза (e14 и e18) и постнатального развития (p14, p28, p60) в гиппокампе и фронтальной коре мышей BTBR с аутистизм-подобным поведением по сравнению с нейротипичной линией C57BL/6 J. У эмбрионов BTBR на 14-й день пренатального развития в гиппокампе и во фронтальной коре установлено увеличение экспрессии гена *Ngfr*, кодирующего рецептор $p75^{NTR}$, трансдукция сигнала которого в эмбриогенезе приводит к активации апоптоза. Снижение экспрессии генов *Cdnf*, *Bdnf* и его рецептора *Ntrkb2*, а также дофаминовых рецепторов (*Drd1*, *Drd2*) у мышей BTBR обнаружено в постнатальный период преимущественно во фронтальной коре, при этом в гиппокампе у половозрелых особей (p60) зафиксировано падение уровня лишь мРНК *Drd2*. Полученные результаты позволяют предположить, что снижение в постнатальном периоде экспрессии генов *Cdnf*, *Bdnf* и *Ntrkb2*, а также дофаминовых рецепторов во фронтальной коре может приводить к существенным изменениям, характерным для РАС, как морфологии нейронов, так и дофаминовой нейротрансмиссии в корковых структурах мозга. Вместе с тем установленный рост экспрессии $p75^{NTR}$ в критический для развития гиппокампа и фронтальной коры 14-й день эмбриогенеза, возможно, является ключевым для формирования раннего аутизма.

Ключевые слова: аутизм; мыши BTBR и C57BL/6 J; BDNF; CDNF; рецепторы дофамина; онтогенез; гиппокамп; фронтальная кора.

Для цитирования: Правикова П.Д., Арссан М.А., Заливина Е.А., Кондаурова Е.М., Куликова Е.А., Белокопытова И.И., Науменко В.С. Паттерны экспрессии рецепторов дофамина и основных элементов нейротрофических (BDNF, CDNF) систем в критические периоды онтогенеза в структурах мозга мышей с аутизм-подобным поведением (BTBR) или его отсутствием (C57BL/6 J). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):407-415. DOI 10.18699/vjgb-24-46

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00028).

Благодарности. Содержание и разведение животных поддержано бюджетным проектом FWNR-2022-0023.

Dopamine receptors and key elements of the neurotrophins (BDNF, CDNF) expression patterns during critical periods of ontogenesis in the brain structures of mice with autism-like behavior (BTBR) or its absence (C57BL/6 J)

P.D. Pravikova, M.A. Arssan, E.A. Zalivina, E.M. Kondaurova, E.A. Kulikova, I.I. Belokopytova, V.S. Naumenko

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
PollyPravi@yandex.ru

© Правикова П.Д., Арссан М.А., Заливина Е.А., Кондаурова Е.М., Куликова Е.А., Белокопытова И.И., Науменко В.С., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. Analysis of the mechanisms underlying autism spectrum disorder (ASD) is an urgent task due to the ever-increasing prevalence of this condition. The study of critical periods of neuroontogenesis is of interest, since the manifestation of ASD is often associated with prenatal disorders of the brain development. One of the currently promising hypotheses postulates a connection between the pathogenesis of ASD and the dysfunction of neurotransmitters and neurotrophins. In this study, we investigated the expression of key dopamine receptors (*Drd1*, *Drd2*), brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*), its receptors (*Ntrkb2*, *Ngfr*) and the transcription factor *Creb1* that mediates BDNF action, as well as cerebral dopamine neurotrophic factor (*Cdnf*) during the critical periods of embryogenesis (e14 and e18) and postnatal development (p14, p28, p60) in the hippocampus and frontal cortex of BTBR mice with autism-like behavior compared to the neurotypical C57BL/6 J strain. In BTBR embryos, on the 14th day of prenatal development, an increase in the expression of the *Ngfr* gene encoding the $p75^{NTR}$ receptor, which may lead to the activation of apoptosis, was found in the hippocampus and frontal cortex. A decrease in the expression of *Cdnf*, *Bdnf* and its receptor *Ntrkb2*, as well as dopamine receptors (*Drd1*, *Drd2*) was detected in BTBR mice in the postnatal period of ontogenesis mainly in the frontal cortex, while in the hippocampus of mature mice (p60), only a decrease in the *Drd2* mRNA level was revealed. The obtained results suggest that the decrease in the expression levels of CDNF, BDNF-TrkB and dopamine receptors in the frontal cortex in the postnatal period can lead to significant changes in both the morphology of neurons and dopamine neurotransmission in cortical brain structures. At the same time, the increase in $p75^{NTR}$ receptor gene expression observed on the 14th day of embryogenesis, crucial for hippocampus and frontal cortex development, may have direct relevance to the manifestation of early autism.

Key words: autism; BTBR and C57BL/6 J mice; BDNF; CDNF; dopamine receptors; ontogenesis; hippocampus; frontal cortex.

For citation: Pravikova P.D., Arssan M.A., Zalivina E.A., Kondaurova E.M., Kulikova E.A., Belokopytova I.I., Naumenko V.S. Dopamine receptors and key elements of the neurotrophins (BDNF, CDNF) expression patterns during critical periods of ontogenesis in the brain structures of mice with autism-like behavior (BTBR) or its absence (C57BL/6 J). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):407-415. DOI 10.18699/vjgb-24-46

Введение

Впервые описанный еще в 1943 г. (Kanner, 1943) аутизм (ныне – расстройство аутистического спектра, РАС) – группа состояний, вызванных нарушениями пренатального и раннего постнатального нейроонтогенеза, сохраняется у человека на протяжении жизни. Расстройство аутистического спектра характеризуется стойким снижением способности инициировать и поддерживать социальные взаимодействия и коммуникацию, а также рядом ограниченных и повторяющихся негибких паттернов поведения. Данные Центра по контролю и профилактике заболеваний США показывают неуклонное повышение числа детей с диагнозом РАС: за 2023 г. один ребенок из 36, тогда как в 2010 г. встречаемость РАС составляла 1 %. Вместе с тем, согласно данным как Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), так и Минздрава России (Письмо Минздрава России от 08.05.2013 № 15-3/10/1-2140), распространенность РАС составляет около 1 % детской популяции.

В настоящее время нет единой концепции патогенеза РАС, тем не менее большинство гипотез связывает развитие этого состояния с ранними нейроонтогенетическими нарушениями, приводящими к искажениям функций психики (Hashem et al., 2020). В связи с этим особое внимание при исследовании механизмов возникновения РАС уделяется раннему внутриутробному развитию мозга (Courchesne et al., 2020). Исследования с применением индуцированных стволовых клеток, полученных от людей с РАС, подтвердили пренатальное происхождение расстройства (Adhya et al., 2021). Установлены высокая скорость пролиферации клеток, снижение степени дифференцировки и созревания ГАМК-ергических интернейронов (Mariani et al., 2015). Аномальная пролиферация и избыточный пренатальный нейрогенез у людей с РАС, очевидно, объясняют данные об увеличении числа как корковых нейронов (Courchesne et al., 2011), так и в целом массы мозга (Sacco et al., 2015). Кроме того, пик экспрессии большинства предполагаемых генов риска развития РАС происходит именно в пренатальный период (Satterstrom et al., 2020) и установлен в ряде областей мозга, включая корковые зоны и гиппокамп (Krishnan et al., 2016; Courchesne et al., 2019). Одна из морфологических особенностей РАС – снижение объема, а иногда и полная агенезия мозолистого тела (Frazier, Hardan, 2009). Вместе с тем изменение объема мозолистого тела, очевидно, является следствием внутриутробных нарушений развития, поскольку у млекопитающих его формирование приходится на последнюю стадию эмбриогенеза (Richards et al., 2004).

Нейротрансмиттер дофамин (ДА) участвует в модуляции процессов обучения, вознаграждения и эмоционального контроля, проявление которых нарушается при аутизме (Hashem et al., 2020). У людей с РАС отмечается ряд полиморфизмов в генах, кодирующих ДА-транспортер (DiCarlo et al., 2019), ферменты метаболизма ДА (Yoo et al., 2013) и ДА-рецепторы (Hettinger et al., 2008; Staal et al., 2015). Кроме того, ДА-нейроны, полученные из плюрипотентных стволовых клеток пациентов, страдающих аутизмом, характеризуются морфологическими изменениями и нарушениями в Ca^{2+} трансдукции (Nguyen et al., 2018). На основе этих данных предположена связь патогенеза РАС с дисфункцией ДА-системы мозга (Pavăl, 2017).

Нейротрофические факторы привлекают особое внимание, поскольку они играют ключевую роль в регуляции роста и развития нейронов, а также в контроле нейропластичности (Popova, Naumenko, 2019). Нейротрофический фактор мозга (BDNF) – один из наиболее изученных нейротрофинов, который контролирует синаптогенез, запускает долговременную потенциацию и принимает участие в формировании памяти (Castrén, Antila, 2017). Показана связь между пониженным уровнем BDNF в крови у новорожденных и увеличенным риском развития РАС (Liu et al., 2021). В то же время посмертные исследования мозга у детей с РАС установили увеличение числа префронталь-

ных нейронов, что может быть следствием нарушения активности BDNF-системы и приводить к избытку образования аксональных связей (Anghelescu, Dettling, 2012). Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF), впервые описанный в 2007 г., – неконвенциональный фактор роста, который локализован преимущественно в полосатом теле, черной субстанции, гиппокампе, коре и мозжечке (Lindholm et al., 2007, 2008). В настоящее время CDNF проходит клинические испытания в качестве лекарства от болезни Паркинсона (Lindholm, Saarma, 2022), поскольку он способен замедлять дегенерацию ДА-нейронов (Voutilainen et al., 2011). Вместе с тем взаимосвязь нейротрофинов и ДА-системы на разных этапах онтогенеза в контексте развития аутизма практически не изучена.

Целью исследования стало выявление роли ДА-системы и нейротрофических факторов в развитии аутизма путем анализа паттернов экспрессии дофаминовых рецепторов (*Drd1*, *Drd2*) и *Cdnf*, а также *Bdnf*, его рецепторов (*Ntrkb2*, *Ngfr*) и транскрипционного фактора *Creb1*, участвующего в реализации эффектов BDNF, в структурах мозга мышей линии BTBR, являющихся моделью аутизма, по сравнению с нейротипичными мышами линии C57BL/6 J в различные периоды онтогенеза.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Линия мышей BTBR – признанная идиопатическая модель аутизма (Crawley, 2023), поскольку характеризуется сниженным уровнем социального взаимодействия, а также стереотипностью поведения (Bolivar et al., 2007; McFarlane et al., 2008). Эксперименты проводили на самцах мышей, свободных от видоспецифических патогенов (SPF), инбредных линий BTBR T+tf/J (BTBR) и C57BL/6 J с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Животных содержали в стандартных условиях при искусственном 14-часовом освещении, постоянных влажности (60 %) и температуре (+23 °C) и свободном доступе к сбалансированному корму и воде. Все исследования с участием животных были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН и соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003), а также международным рекомендациям по работе с животными.

Дизайн эксперимента. При аутизме нарушаются регулируемая гиппокампом функция консолидации памяти, а также исполнительная функция и социальное поведение, за осуществление которых ответственна главным образом фронтальная кора. Кроме того, на посмертных срезах головного мозга у людей с РАС обнаружены уменьшенный размер клеток и повышенная плотность их как в гиппокампе, так и во фронтальной коре (Kemper, Bauman, 1998; Courchesne et al., 2011). Исходя из этого исследование данных структур мозга в контексте механизмов манифестации РАС представляло особый интерес.

Одна из самых изменчивых структур при патогенезе РАС – гиппокамп, формирование которого начинается на 14-й день эмбриогенеза (Mangale et al., 2008), при этом на 18-й день пренатального развития он уже сформирован (Loones et al., 2000). Кроме того, к 17-му дню эмбриогенеза окончательно формируется мозолистое тело (Richards et al., 2004), агенезия которого регистрируется как у линии мышей BTBR (Bohlen et al., 2012), так и часто у людей с РАС (Frazier, Hardan, 2009). Один из критериев РАС – нарушения функционирования сенсорных систем вследствие повышенной или пониженной чувствительности к стимулам (DSM-5, МКБ-11). Поскольку у грызунов глаза открываются на 12–13-й день и их сенсорное восприятие становится полноценным (Rochefort et al., 2009), представляло интерес исследовать группу мышей в возрасте 14 дней. Ювенильный период – важный постнатальный этап развития при исследовании аутизм-подобного поведения, так как у мышей линии BTBR низкий уровень социального взаимодействия проявляется уже на 28-й день после рождения (McFarlane et al., 2008). Таким образом, были выбраны следующие периоды онтогенеза: 14-й и 18-й день эмбриогенеза, а также 14, 28 и 60-й (достижение половозрелости) дни постнатального развития.

Самцов (p14, p28, p60), а также эмбрионов на 14-й или 18-й день пренатального развития линий BTBR и C57BL/6 J выводили из эксперимента методом декапитации, а их гиппокамп и префронтальную кору извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °C. Для групп e14 и e18 также проводили биопсию части хвоста для последующего генотипирования Y-хромосомы (*Sry*). Половую принадлежность мышей p14 и старше определяли по первичным половым признакам при вскрытии. Количество особей в экспериментальной группе определенного дня онтогенеза (e14, e18, p14, p28, p60) составляло 10 для каждой линии.

Получение эмбрионов и определение их половой принадлежности. Для получения эмбрионов в условии *in vivo* половозрелых самок мышей линий BTBR и C57BL/6 J, находящихся в стадии эструса, которую определяли с помощью анализа влагалищных мазков, ссаживали на ночь с самцами соответствующих линий. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считали первым днем беременности. Для генотипирования Y-хромосомы (*Sry*) геномную ДНК выделяли из хвостовой ткани эмбрионов: помещали на два часа при 50 °C в лизирующий раствор, содержащий протеазу K, с последующей экстракцией в насыщенном солевом растворе в соответствии с ранее описанным протоколом (Aljanabi, Martinez, 1997). Образцы ДНК были амплифицированы с праймерами (см. таблицу) (Wambach et al., 2014), после чего продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле и визуализировали с помощью окрашивания бромистым этидием. В работе использовали эмбрионы с наличием Y-хромосомы.

ОТ-ПЦР. *Выделение общей РНК.* Общая РНК была выделена с применением TRIzol Reagent (Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную РНК разводили водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при –70 °C. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее (Kulikov et al., 2005; Naumenko, Kulikov, 2006; Naumenko et al., 2008).

Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Длина продукта ПЦР, п. н.
rPol2	F 5′-tgtgacaactccatacaatgc-3′ R 5′-ctctcttagtgaatttgcgtact-3′	60	194
Cdnf	F 5′-cggtggacctgtggaagatg-3′ R 5′-acatatttgggggccagctc-3′	60	130
Bdnf	F 5′-tagcaaaaagagaattggctg-3′ R 5′-tttcaggtcatggatatgtcc-3′	59	255
Ntrk2	F 5′-cattcactgtgagaggcaacc-3′ R 5′-atcagggtgtagtctccgttatt-3′	63	175
Ngfr	F 5′-acaacacccagcacccagga-3′ R 5′-cacaaccacagcagccaaga-3′	62	171
Creb1	F 5′-gctggctaacaatggtacggat-3′ R 5′-tggttgctgggcactagaat-3′	64	140
Drd1	F 5′-ggaaaccctgtcgaatgctctc-3′ R 5′-ccagccaaaccacacaaatacatcg-3′	59	222
Drd2	F 5′-tccgccacttcttgacatacattg-3′ R 5′-cccatccacagcctcctctaag-3′	64	203
Sry	F 5′-ttgtctagagagcatggagggccatgtcaa-3′ R 5′-ccactcctctgtgacactttagccctccga-3′	64	268

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция. Обратную транскрипцию и количественную ПЦР в реальном времени проводили согласно протоколу, описанному в деталях ранее (Kulikov et al., 2005; Naumenko, Kulikov, 2006; Naumenko et al., 2008). Использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (мРНК *Polr2a*) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчета уровня мРНК исследуемых генов. Внешним стандартом служила ДНК мыши известной концентрации, что позволяло контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов и *Polr2a* в образцах (Kulikov et al., 2005; Naumenko, Kulikov, 2006; Naumenko et al., 2008). Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (см. таблицу), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных Ensembl database, и синтезированы в компании «БИОССЕТ» (Россия).

Статистический анализ. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего (m ± SEM). Для парного сравнения средних между линиями мышей определенного дня развития применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Достоверными считались различия при критерии значимости $p < 0.05$. Нормальность распределения проверялась с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Критерий Диксона использовали для выявления и исключения крайних отклонений из анализа.

Результаты

У мышей линии BTBR в гиппокампе зафиксировано достоверное увеличение уровня мРНК гена *Drd1* лишь на 14-й день постнатального развития по сравнению с линией C57BL/6 J, тогда как во фронтальной коре обнаружено, напротив, снижение на 28-й день постнатального периода (рис. 1, *а*). В то же время для половозрелых особей (p60) как в гиппокампе, так и во фронтальной коре не было зафиксировано межлинейных различий в уровне экспрессии гена *Drd1*, который в гиппокампе существенно снижался по сравнению с другими этапами постнатального развития (p14, p28) до значений внутриутробного периода (e18).

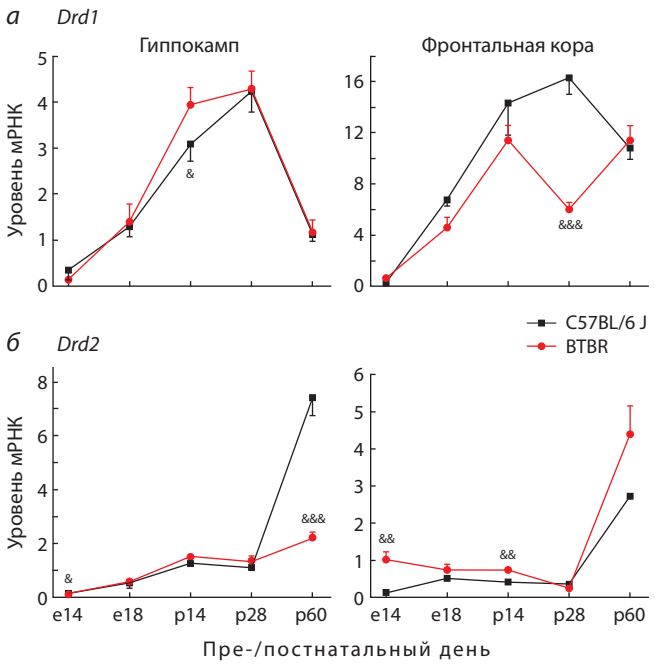


Рис. 1. Уровень мРНК генов *Drd1* (*а*) и *Drd2* (*б*) в гиппокампе и во фронтальной коре у мышей линий C57BL/6 J и BTBR в различные периоды пре- и постнатального развития.

Здесь и на рис. 2–4: экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. $n = 8–10$.
Достоверность различий: $^{\&}p < 0.05$; $^{\&\&}p < 0.01$; $^{\&\&\&}p < 0.001$ – межлинейное сравнение в пределах определенного дня развития.

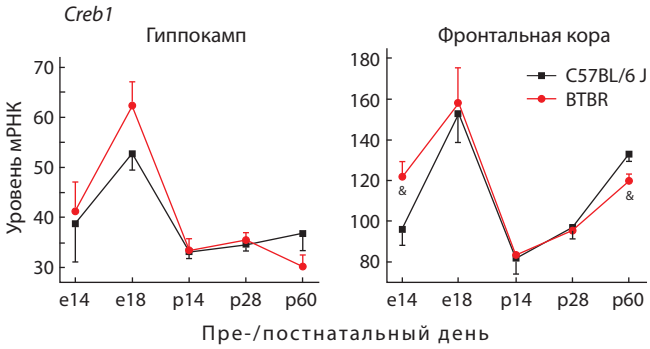


Рис. 2. Уровень мРНК гена, кодирующего транскрипционный фактор CRE-связывающего белка (*Creb1*), в гиппокампе и во фронтальной коре у мышей линий C57BL/6 J и BTBR в различные периоды пре- и постнатального развития.

Достоверность различий: $^{\&}p < 0.05$ – межлинейное сравнение в пределах определенного дня развития.

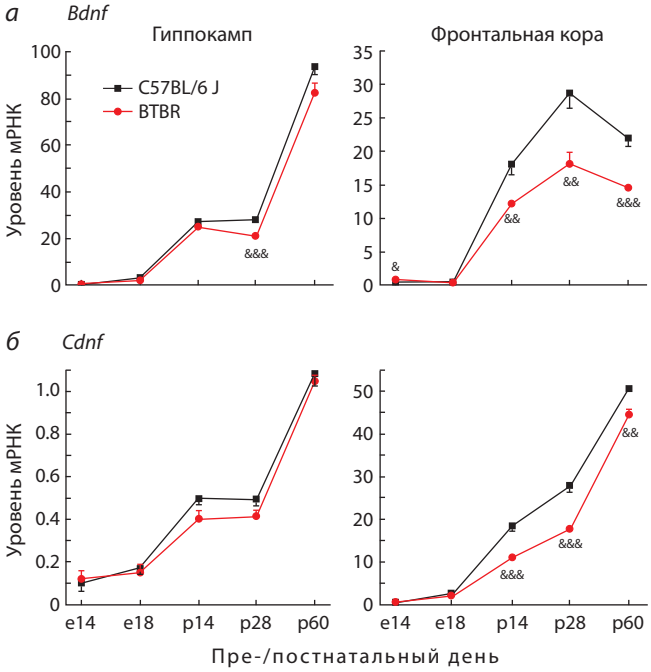


Рис. 3. Уровень мРНК генов *Bdnf* (*а*) и *Cdnf* (*б*) в гиппокампе и во фронтальной коре у мышей линий C57BL/6 J и BTBR в различные периоды пре- и постнатального развития.

Достоверность различий: $^{\&\&}p < 0.01$; $^{\&\&\&}p < 0.001$ – межлинейное сравнение в пределах определенного дня развития.

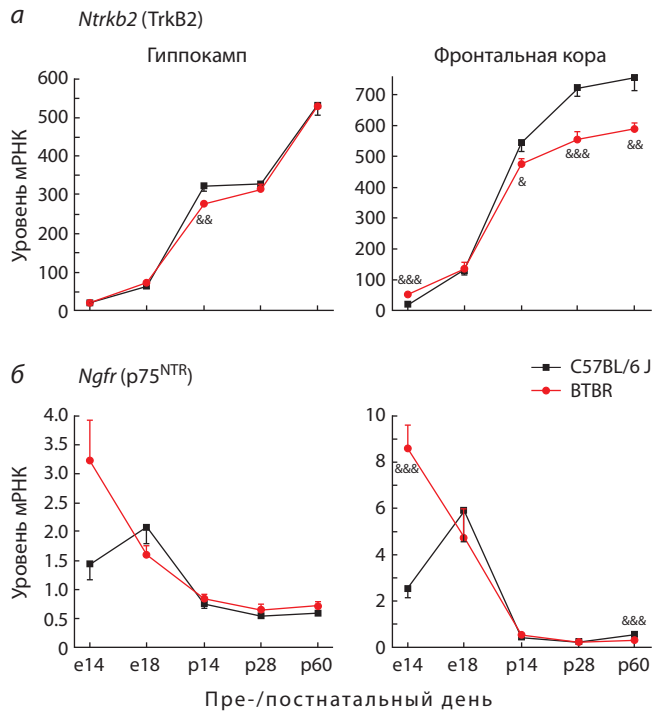


Рис. 4. Уровень мРНК генов *Ntrkb2* (*а*) и *Ngfr* (*б*) в гиппокампе и во фронтальной коре у мышей линий C57BL/6 J и BTBR в различные периоды пре- и постнатального развития.

Достоверность различий: $^{\&}p < 0.05$; $^{\&\&}p < 0.01$; $^{\&\&\&}p < 0.001$ – межлинейное сравнение в пределах определенного дня развития.

Установлено увеличение уровня мРНК гена *Drd2* во фронтальной коре у эмбрионов линии BTBR на 14-й день пренатального развития, которое нивелировалось на 18-й день эмбриогенеза (см. рис. 1, *б*). Вместе с тем у мышей BTBR во фронтальной коре зафиксировано увеличение уровня экспрессии гена *Drd2* на 14-й день постнатального развития, при этом при достижении половой зрелости (p60) достоверных отличий не обнаружено. Между тем в гиппокампе межлинейные различия в уровне мРНК гена *Drd2* были установлены лишь у половозрелых мышей: у линии BTBR зафиксировано снижение, по сравнению с группой C57Bl/6J, у которой наблюдалось резкое увеличение в уровне мРНК *Drd2* после 28-го дня постнатального периода.

Во фронтальной коре у линии BTBR зафиксировано увеличение уровня мРНК гена *Creb1* на 14-й день эмбриогенеза, тогда как у мышей в возрасте 60 дней установлено, напротив, снижение (рис. 2). Данная динамика уровня экспрессии *Creb1* у линии BTBR согласуется с изменениями в уровне мРНК гена *Bdnf*: на 14-й день эмбриогенеза – увеличение, на 60-й день постнатального развития – снижение (рис. 3, *а*). В то же время в гиппокампе не выявлено межлинейных различий в экспрессии гена *Creb1* в рассматриваемые периоды онтогенеза. Наряду с этим в гиппокампе и во фронтальной коре пик экспрессии гена *Creb1* приходился на 18-й день эмбриогенеза, при этом во фронтальной коре минимальное значение в уровне мРНК *Creb1* – 14-й день постнатального периода (см. рис. 2).

У мышей линии BTBR во фронтальной коре в исследуемые периоды постнатального развития (p14, p28, p60) установлено снижение уровня мРНК транслируемого экзона гена *Bdnf*, тогда как в гиппокампе межлинейные различия установлены только на 28-й день постнатального развития (см. рис. 3, *а*). Выявленные изменения в экспрессии *Bdnf* во фронтальной коре в постнатальный период у мышей линии BTBR согласуются с уменьшением в уровне мРНК гена *Ntrkb2* (рис. 4, *а*), кодирующего основной рецептор нейротрофина BDNF – тирозинкиназный рецептор B (TrkB).

Сходным образом с изменениями в уровне мРНК гена *Bdnf* во фронтальной коре в постнатальный период у мышей линии BTBR менялась динамика уровня экспрессии гена *Cdnf*: снижение уровня мРНК *Cdnf* на 14, 28, 60-й дни постнатального развития (см. рис. 3, *б*). Вместе с тем в гиппокампе не было установлено межлинейных различий в уровне экспрессии гена *Cdnf* в периоды как внутриутробного, так и постнатального развития (см. рис. 3, *б*), при этом вне зависимости от линии резкий рост в экспрессии генов *Cdnf*, *Bdnf* и *Ntrkb2* наблюдался после 28-го дня постнатального развития.

При анализе динамики уровня мРНК гена *Ngfr*, кодирующего рецептор p75^{NTR} (рецептор предшественника BDNF: proBDNF), зафиксировано его увеличение на 14-й день эмбриогенеза у линии BTBR как в гиппокампе, так и во фронтальной коре (см. рис. 4, *б*). Вместе с тем во фронтальной коре на 60-й день постнатального развития, при достижении половозрелости, у мышей BTBR уровень мРНК гена *Ngfr* достоверно снижался. Пик уровня экспрессии в исследуемых структурах мозга у линии BTBR наблюдался на 14-й день пренатального развития, тогда как у мышей линий C57BL/6 J – на 18-й день эмбриогенеза (см. рис. 4, *б*) на фоне увеличения мРНК гена *Creb1* (см. рис. 2).

Обсуждение

У людей, страдающих РАС, отмечаются изменения в морфологии нейронов (Minshew, Williams, 2007). В связи с этим анализ нейроторофинов является перспективной задачей для исследования механизмов возникновения аутизма. Как известно, белок BDNF синтезируется в виде предшественника (proBDNF), который затем расщепляется до зрелой формы (mBDNF) (Lessmann et al., 2003). mBDNF ответственен за увеличение синаптической пластичности, тогда как proBDNF, напротив, опосредует ее снижение (Koshimizu et al., 2009). proBDNF, уровень экспрессии которого повышен в пренатальный период (Yang et al., 2009), – ключевой нейротрофический фактор, регулирующий развитие центральной нервной системы посредством влияния на нейрогенез (Koshimizu et al., 2009). Кроме того, увеличенный уровень proBDNF был установлен на посмертных срезах веретенообразной извилины у людей с аутизмом (Garcia et al., 2012), что может быть причиной снижения как дифференцирования нейронов, так и образования на них дендритных шипиков (Teng et al., 2005). Действие BDNF опосредуется двумя рецепторами, TrkB с тирозинкиназной активностью и p75^{NTR}. Ранее было выдвинуто предложение рассмотреть p75^{NTR} в качестве биомаркера РАС, поскольку в периферической крови было обнаружено повышение уровня его мРНК у людей, страдающих аутизмом (Segura et al., 2015).

В настоящей работе нами установлено, что на 14-й день эмбриогенеза у мышей линии BTBR в гиппокампе и во фронтальной коре, когда нейрогенез в этих структурах должен достигать максимума (Finlay, Darlington, 1995; Chen et al., 2017), уровень мРНК гена *Ngfr*, кодирующего рецептор p75^{NTR}, повышен, причем к 18-му дню пренатального развития эти различия уже нивелируются. Несмотря на то что пути трансдукции сигнала p75^{NTR} чрезвычайно разнообразны (Lu et al., 2005), известно о стимуляции клеточной смерти при связывании proBDNF с рецепторами p75^{NTR} (Teng et al., 2005). Можно предположить, что у мышей BTBR на 14-й день пренатального развития повышена апоптотическая активность в гиппокампе и фронтальной коре на фоне нарушений синаптогенеза и снижения способности нейронов к формированию функциональных связей, что приводит к поведенческому дефициту, наблюдаемому при аутизме (Wei et al., 2014). С другой стороны, усиление апоптоза может приводить к агенезии мозолистого тела, фиксируемой у мышей BTBR (Bohlen et al., 2012), а также нередко у людей при аутизме (Frazier, Hardan, 2009). Вместе с тем пик уровня мРНК *Ngfr* у нейротипичной линии C57BL/6 J в гиппокампе и во фронтальной коре приходился на 18-й день эмбриогенеза, который затем резко снижался на фоне окончания нейрогенеза в этих клеточных популяциях (Finlay, Darlington, 1995; Chen et al., 2017). Обнаруженное во фронтальной коре увеличение уровня экспрессии рецептора p75^{NTR} у мышей BTBR на 14-й день эмбриогенеза сопровождается ростом уровня мРНК транслируемого экзона *Bdnf*, его транскрипционного фактора *Creb1*, а также гена *Ntrkb2*, кодирующего TrkB, рецептор mBDNF. По всей видимости, увеличение экспрессии BDNF-TrkB-системы является компенсаторным механизмом в ответ на предполагаемый рост апоптотической активности, опосредованной рецепторами p75^{NTR}, поскольку BDNF при связывании с TrkB запускает синтез белков, рост и созревание нейронов (Fenner, 2012). В то же время в постнатальный период у мышей линии BTBR во фронтальной коре установлено снижение уровня экспрессии как *Bdnf*, так и его рецептора *Ntrkb2* (TrkB) с 14-го дня после рождения и до половой зрелости, что может указывать на падение нейропротекторных и нейротрофических свойств корковых структур мозга мышей и приводить к аутизм-подобному поведению. В подтверждение этого ранее установлено, что сверхэкспрессия BDNF в гиппокампе снижает у мышей BTBR тревожность и стереотипное поведение, являющиеся диагностическими критериями при РАС (Ilchibaeva et al., 2023).

На линии BTBR установлено, что нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе не повлиял на пространственную память и фосфорилирование транскрипционного фактора CREB (Belokopytova et al., 2022), хотя такой эффект был обнаружен на мышах линии C57BL/6 J (Kondaurova et al., 2021). На основании этих данных было предположено нарушение функциональной активности транскрипционного фактора CREB (стимулирующего экспрессию BDNF) у мышей BTBR, что может быть причиной установленных у них в настоящей работе нарушений BDNF-системы.

Расстройство аутистического спектра часто сопровождается дисфункцией в работе некоторых нейротрансмиттерных систем (Rodnyy et al., 2023), в частности отмечены повышенный уровень серотонина (Pourhamzeh et al., 2022), а также нарушения работы ДА-системы мозга, проявляющиеся в виде дисфункции как его метаболизма (Yoo et al., 2013), так и трансдукции сигнала (Staal et al., 2015; DiCarlo et al., 2019). Нейротрансмиттер дофамин может оказывать влияние на клеточную пролиферацию и

дифференциацию клеток конечного мозга в эмбриональный период развития, при этом блокада ДА-рецептора 1-типа (D_1R) приводит к снижению скорости клеточного деления, тогда как стимуляция ДА-рецептора 2-го типа (D_2R), напротив, – к его активации (Popolo et al., 2004). С другой стороны, трансдукция ДА-сигнала при активации D_2R снижает миграцию ГАМК интернейронов конечного мозга (Crandall et al., 2007), что может приводить к нарушению процессов торможения в корковых зонах, которые отмечаются как у мышей линии BTBR (Cellot et al., 2016), так и зачастую у людей, страдающих аутизмом (Enticott et al., 2013). Эти данные хорошо согласуются с выявленным нами повышением экспрессии гена *Drd2* во фронтальной коре и гиппокампе мышей BTBR на 14-й день пренатального развития, которое, вероятно, может способствовать нарушениям формирования и функционирования данных структур мозга.

Имеется большое количество данных о взаимосвязи BDNF- и ДА-систем. Например, BDNF предложен в качестве перспективного агента в лечении болезни Паркинсона, учитывая его стимулирующее влияние как на высвобождение ДА (Neal et al., 2003), так и в целом трофический эффект на ДА-нейроны (Palasz et al., 2020) при активации экспрессии *Bdnf* (Küppers, Beyer, 2001). В связи с этим выявленные на 14-й день эмбриогенеза у линии BTBR однонаправленные изменения экспрессии как D_2R, так и BDNF-TrkB согласуются с представлениями о взаимосвязи дофаминовой и BDNF-систем. При этом зарегистрированное снижение уровня мРНК *Drd2* в гиппокампе у мышей BTBR половозрелого возраста на фоне отсутствия изменений в экспрессии генов нейротрофической системы, возможно, вследствие нарушения CREB-зависимого эффекторного пути (Belokopytova et al., 2022), приводит к поведенческому дефициту памяти и обучения. Вместе с тем уровень экспрессии гена *Drd1* не изменялся у линии BTBR в исследуемые периоды эмбриогенеза в гиппокампе и во фронтальной коре. В то же время постнатальные межлинейные различия в уровне мРНК гена *Drd1* выявлены как в гиппокампе, так и во фронтальной коре. У мышей BTBR уровень экспрессии гена *Drd1* в гиппокампе был повышен на 14-й день постнатального развития, тогда как во фронтальной коре, напротив, установлено снижение, но уже в ювенильный период (p28). Несмотря на то что при достижении половой зрелости (p60) не установлены межлинейные различия в уровне экспрессии *Drd1* в исследуемых структурах мозга, зафиксированные изменения уровня мРНК *Drd1* в критические периоды после рождения могут быть предпосылками к нарушениям обучения и памяти, наблюдаемым у мышей BTBR уже в ювенильном возрасте (McFarlane et al., 2008). Поскольку обнаруженное снижение уровня мРНК *Drd1* во фронтальной коре мышей BTBR на 28-й день после рождения сопровождалось падением экспрессии генов *Bdnf* и *Ntrkb2* (TrkB), предполагается участие BDNF-TrkB-сигнала в регуляции экспрессии D_1R. К тому же известно, что сверхэкспрессия *Bdnf* в гиппокампе мышей BTBR приводит к увеличению экспрессии гена *Drd1* на фоне снижения тревожности и стереотипии (Ilchibaeva et al., 2023).

С регуляцией нейротрансмиссии ДА-системы также нередко связывают открытый сравнительно недавно неканонический нейротрофин CDNF, обладающий нейропротекторными свойствами при состояниях, связанных с дегенерацией ДА-нейронов (Voutilainen et al., 2011). На сегодняшний день отсутствуют какие-либо данные о роли CDNF в патогенезе РАС. Нами впервые обнаружено снижение уровня экспрессии гена *Cdnf* во фронтальной коре мышей BTBR с аутизм-подобным поведением на протяжении всего исследованного периода постнатального развития, начиная с открытия глаз (p14) и закачивая наступлением половой зрелости (p60). Учитывая, что для CDNF характерно антиапоптотическое и нейротрофическое действие (Boňok et al., 2018), предполагается, что у мышей BTBR во фронтальной коре повышен риск активации клеточной гибели и снижены цитопротективные свойства в постнатальный период развития, что может приводить в том числе к нарушениям ДА-нейротрансмиссии и манифестации аутизм-подобного поведения.

Заключение

Таким образом, в гиппокампе и во фронтальной коре мышей BTBR, характеризующихся аутизм-подобным поведением, была показана существенная дисрегуляция паттернов экспрессии ключевых рецепторов ДА-системы мозга, *Cdnf*, *Bdnf* и его рецепторов, а также транскрипционного фактора CREB. Предположено, что обнаруженные нарушения экспрессии исследуемых генов на 14-й день эмбриогенеза являются критическими для формирования аутизм-подобного фенотипа. Вместе с тем снижение экспрессии *Cdnf*, а также *Bdnf* и его рецептора *Ntrkb2* во фронтальной коре в исследуемые периоды постнатального развития, по всей видимости, способствует критическому изменению морфологии нейронов корковых структур мозга. В то же время установленное снижение экспрессии *Drd2* в постнатальный период может быть связано с нарушениями обучения и памяти, наблюдаемыми у мышей линии BTBR.

Список литературы / References

Adhya D., Swarup V., Nagy R., Dutan L., Shum C., Valencia-Alarcyn E.P., Jozwik K.M., Mendez M.A., Horder J., Loth E., Nowosiad P., Lee I., Skuse D., Flinter F.A., Murphy D., McAlonan G., Geschwind D.H., Price J., Carroll J., Srivastava D.P., Baron-Cohen S. Atypical neurogenesis in induced pluripotent stem cells from autistic individuals. *Biol. Psychiatry.* 2021;89(5):486-496. DOI 10.1016/j.biopsych.2020.06.014

Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(22):4692-4693. DOI 10.1093/nar/25.22.4692

Anghelescu I., Dettling M. Neuron number in children with autism. *JAMA.* 2012;307(8):783. DOI 10.1001/jama.2012.191

Belokopytova I.I., Kondaurova E.M., Kulikova E.A., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S., Popova N.K. Effects of the *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown in the hippocampus of BTBR mice on the autistic-like behavior, expression of serotonin 5-HT1A and D2 dopamine receptors, and CREB and NF-κB intracellular signaling. *Biochemistry* (*Mosc.*). 2022;87(10):1206-1218. DOI 10.1134/S0006297922100145

Bohlen M.O., Bailoo J.D., Jordan R.L., Wahlsten D. Hippocampal commissure defects in crosses of four inbred mouse strains with absent corpus callosum. *Genes Brain Behav.* 2012;11(7):757-766. DOI 10.1111/j.1601-183X.2012.00802.x

Boňok V., Yu L.Y., Palgi J., Arumäe U. Antioxidative CXXC peptide motif from mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor an-

tagonizes programmed cell death. *Front. Cell Dev. Biol.* 2018;6:106. DOI 10.3389/fcell.2018.00106

Bolivar V.J., Walters S.R., Phoenix J.L. Assessing autism-like behavior in mice: variations in social interactions among inbred strains. *Behav. Brain Res.* 2007;176(1):21-26. DOI 10.1016/j.bbr.2006.09.007

Castrén E., Antila H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol. Psychiatry.* 2017;22(8):1085-1095. DOI 10.1038/mp.2017.61

Cellot G., Maggi L., Di Castro M.A., Catalano M., Migliore R., Migliore M., Scattoni M.L., Calamandrei G., Cherubini E. Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice. *Sci. Rep.* 2016;6:31696. DOI 10.1038/srep31696

Chen V.S., Morrison J.P., Southwell M.F., Foley J.F., Bolon B., Elmore S.A. Histology atlas of the developing prenatal and postnatal mouse central nervous system, with emphasis on prenatal days E7.5 to E18.5. *Toxicol. Pathol.* 2017;45(6):705-744. DOI 10.1177/0192623317728134

Courchesne E., Mouton P.R., Calhoun M.E., Semendeferi K., Ahrens-Barbeau C., Hallet M.J., Barnes C.C., Pierce K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* 2011;306(18):2001-2010. DOI 10.1001/jama.2011.1638

Courchesne E., Pramparo T., Gazestani V.H., Lombardo M.V., Pierce K., Lewis N.E. The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype. *Mol. Psychiatry.* 2019;24(1):88-107. DOI 10.1038/s41380-018-0056-y

Courchesne E., Gazestani V.H., Lewis N.E. Prenatal origins of ASD: The when, what, and how of ASD development. *Trends Neurosci.* 2020;43(5):326-342. DOI 10.1016/j.tins.2020.03.005

Crandall J.E., McCarthy D.M., Araki K.Y., Sims J.R., Ren J.Q., Bhide P.G. Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. *J. Neurosci*. 2007;27(14):3813-3822. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5124-06.2007

Crawley J.N. Twenty years of discoveries emerging from mouse models of autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2023;146:105053. DOI 10.1016/j.neubiorev.2023.105053

DiCarlo G.E., Aguilar J.I., Matthies H.J., Harrison F.E., Bundschuh K.E., West A., Hashemi P., Herborg F., Rickhag M., Chen H., Gether U., Wallace M.T., Galli A. Autism-linked dopamine transporter mutation alters striatal dopamine neurotransmission and dopamine-dependent behaviors. *J. Clin. Invest.* 2019;129(8):3407-3419. DOI 10.1172/JCI127411

Enticott P.G., Kennedy H.A., Rinehart N.J., Tonge B.J., Bradshaw J.L., Fitzgerald P.B. GABAergic activity in autism spectrum disorders: an investigation of cortical inhibition via transcranial magnetic stimulation. *Neuropharmacology.* 2013;68:202-209. DOI 10.1016/j.neuropharm.2012.06.017

Fenner B.M. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012;23(1-2):15-24. DOI 10.1016/j.cytogfr.2012.01.002

Finlay B.L., Darlington R.B. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science.* 1995;268(5217):1578-1584. DOI 10.1126/science.7777856

Frazier T.W., Hardan A.Y. A meta-analysis of the corpus callosum in autism. *Biol. Psychiatry.* 2009;66(10):935-941. DOI 10.1016/j.biopsych.2009.07.022

Garcia K.L., Yu.G., Nicolini C., Michalski B., Garzon D.J., Chiu V.S., Tongiorgi E., Szatmari P., Fahnestock M. Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012;71(4):289-297. DOI 10.1097/NEN.0b013e31824b27e4

Hashem S., Nisar S., Bhat A.A., Yadav S.K., Azeem M.W., Bagga P., Fakhro K., Reddy R., Frenneaux M.P., Haris M. Genetics of structural and functional brain changes in autism spectrum disorder. *Transl. Psychiatry.* 2020;10(1):229. DOI 10.1038/s41398-020-00921-3

Hettinger J.A., Liu X., Schwartz C.E., Michaelis R.C., Holden J.J. A DRD1 haplotype is associated with risk for autism spectrum disorders in male-only affected sib-pair families. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2008;147B(5):628-636. DOI 10.1002/ajmg.b.30655

Ilchibaeva T., Tsybko A., Lipnitskaya M., Eremin D., Milutinovich K., Naumenko V., Popova N. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mechanisms of autistic-like behavior in BTBR mice: crosstalk with the dopaminergic brain system. *Biomedicines*. 2023;11(5):1482. DOI 10.3390/biomedicines11051482

Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.* 1943;2:217-250

Kemper T.L., Bauman M. Neuropathology of infantile autism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998;57(7):645-652. DOI 10.1097/00005072-199807000-00001

Kondaurova E.M., Plyusnina A.V., Ilchibaeva T.V., Eremin D.V., Rodnyy A.Y., Grygoreva Y.D., Naumenko V.S. Effects of a Cc2d1a/Freud-1 knockdown in the hippocampus on behavior, the serotonin system, and BDNF. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13319. DOI 10.3390/ijms222413319

Koshimizu H., Kiyosue K., Hara T., Hazama S., Suzuki S., Uegaki K., Nagappan G., Zaitsev E., Hirokawa T., Tatsu Y., Ogura A., Lu B., Kojima M. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol. Brain*. 2009;2:27. DOI 10.1186/1756-6606-2-27

Krishnan A., Zhang R., Yao V., Theesfeld C.L., Wong A.K., Tadych A., Volfovsky N., Packer A., Lash A., Troyanskaya O.G. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* 2016;19(11):1454-1462. DOI 10.1038/nn.4353

Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J. Neurosci. Methods.* 2005;141(1):97-101. DOI 10.1016/j.jneumeth.2004.06.005

Küppers E., Beyer C. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport.* 2001;12(6):1175-1179. DOI 10.1097/00001756-200105080-00025

Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 2003;69(5):341-374. DOI 10.1016/s0301-0082(03)00019-4

Lindholm P., Saarma M. Cerebral dopamine neurotrophic factor protects and repairs dopamine neurons by novel mechanism. *Mol. Psychiatry*. 2022;27(3):1310-1321. DOI 10.1038/s41380-021-01394-6

Lindholm P., Voutilainen M.H., Laurén J., Peränen J., Leppänen V.M., Andressoo J.O., Lindahl M., Janhunen S., Kalkkinen N., Timmusk T., Tuominen R.K., Saarma M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*. *Nature.* 2007;448(7149):73-77. DOI 10.1038/nature05957

Lindholm P., Peränen J., Andressoo J.O., Kalkkinen N., Kokaia Z., Lindvall O., Timmusk T., Saarma M. MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 2008;39(3):356-371. DOI 10.1016/j.mcn.2008.07.016

Liu S.H., Shi X.J., Fan F.C., Cheng Y. Peripheral blood neurotrophic factor levels in children with autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Sci. Rep.* 2021;11(1):15. DOI 10.1038/s41598-020-79080-w

Loones M.T., Chang Y., Morange M. The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones.* 2000;5(4):291-305. DOI 10.1379/1466-1268(2000)005<0291:tdohsp>2.0.co;2

Lu B., Pang P.T., Woo N.H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6(8):603-614. DOI 10.1038/nrn1726

Mangale V.S., Hirokawa K.E., Satyaki P.R., Gokulchandran N., Chikbire S., Subramanian L., Shetty A.S., Martynoga B., Paul J.,

Mai M.V., Li Y., Flanagan L.A., Tole S., Monuki E.S. Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. *Science.* 2008;319(5861):304-309. DOI 10.1126/science.1151695

Mariani J., Coppola G., Zhang P., Abyzov A., Provini L., Tomasini L., Amenduni M., Szekely A., Palejev D., Wilson M., Gerstein M., Grigorenko E.L., Chawarska K., Pelphrey K.A., Howe J.R., Vaccarino F.M. FOXG1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell*. 2015;162(2):375-390. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.034

McFarlane H.G., Kusek G.K., Yang M., Phoenix J.L., Bolivar V.J., Crawley J.N. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav.* 2008;7(2):152-163. DOI 10.1111/j.1601-183X.2007.00330.x

Minshew N.J., Williams D.L. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch. Neurol.* 2007;64(7):945-950. DOI 10.1001/archneur.64.7.945

Naumenko V.S., Kulikov A.V. Quantitative assay of 5-HT_{1A} receptor gene expression in the brain. *Mol. Biol.* (*Mosk.*). 2006;40(1):30-36. DOI 10.1134/S0026893306010067

Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. *J. Neurosci. Methods*. 2008;170(2):197-203. DOI 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008

Neal M., Cunningham J., Lever I., Pezet S., Malcangio M. Mechanism by which brain-derived neurotrophic factor increases dopamine release from the rabbit retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44(2):791-798. DOI 10.1167/iovs.02-0557

Nguyen H.T.N., Kato H., Masuda K., Yamaza H., Hirofuji Y., Sato H., Pham T.T.M., Takayama F., Sakai Y., Ohga S., Taguchi T., Nonaka K. Impaired neurite development associated with mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of children with autism spectrum disorder. *Biochem. Biophys. Rep.* 2018;16:24-31. DOI 10.1016/j.bbrep.2018.09.004

Palasz E., Wysocka A., Gasiorowska A., Chalimoniuk M., Niewiadomski W., Niewiadomska G. BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(3):1170. DOI 10.3390/ijms21031170

Pavăl D. A Dopamine hypothesis of autism spectrum disorder. *Dev. Neurosci.* 2017;39(5):355-360. DOI 10.1159/000478725

Popolo M., McCarthy D.M., Bhide P.G. Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon. *Dev. Neurosci.* 2004;26(2-4):229-244. DOI 10.1159/00008214

Popova N.K., Naumenko V.S. Neuronal and behavioral plasticity: the role of serotonin and BDNF systems tandem. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2019;23(3):227-239. DOI 10.1080/14728222.2019.1572747

Pourhamzeh M., Moravej F.G., Arabi M., Shahriari E., Mehrabi S., Ward R., Ahadi R., Joghataei M.T. The roles of serotonin in neuropsychiatric disorders. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022;42(6):1671-1692. DOI 10.1007/s10571-021-01064-9

Richards L.J., Plachez C., Ren T. Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin. Genet.* 2004;66(4):276-289. DOI 10.1111/j.1399-0004.2004.00354.x

Rochefort N.L., Garaschuk O., Milos R.I., Narushima M., Marandi N., Pichler B., Kovalchuk Y., Konnerth A. Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(35):15049-15054. DOI 10.1073/pnas.0907660106

Rodnyy A.Y., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Popova N.K., Kudlay D.A., Naumenko V.S. The brain serotonin system in autism. *Rev. Neurosci.* 2023;35(1):1-20. DOI 10.1515/revneuro-2023-0055

Sacco R., Gabriele S., Persico A.M. Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2015;234(2):239-251. DOI 10.1016/j.pscychresns.2015.08.016

Satterstrom F.K., Kosmicki J.A., Wang J., Breen M.S., De Rubeis S., An J.Y., Peng M., … Guerrero E.E., Dias C.; Autism Sequencing Consortium; iPSYCH-Broad Consortium; Betancur C., Cook E.H., Gallagher L., Gill M., Sutcliffe J.S., Thurm A., Zwick M.E., Børglum A.D., State M.W., Cicek A.E., Talkowski M.E., Cutler D.J., Devlin B., Sanders S.J., Roeder K., Daly M.J., Buxbaum J.D. Large-scale exome sequencing study implicates both developmental and functional changes in the neurobiology of autism. *Cell.* 2020;180(3):568-584.e23. DOI 10.1016/j.cell.2019.12.036

Segura M., Pedreño C., Obiols J., Taurines R., Pamias M., Grünblatt E., Gella A. Neurotrophin blood-based gene expression and social cognition analysis in patients with autism spectrum disorder. *Neurogenetics.* 2015;16(2):123-131. DOI 10.1007/s10048-014-0434-9

Staal W.G., Langen M., van Dijk S., Mensen V.T., Durston S. *DRD3* gene and striatum in autism spectrum disorder. *Br. J. Psychiatry.* 2015;206(5):431-432. DOI 10.1192/bjp.bp.114.148973

Teng H.K., Teng K.K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R.D., Kermani P., Torkin R., Chen Z.Y., Lee F.S., Kraemer R.T., Nykjaer A., Hempstead B.L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci.* 2005;25(22):5455-5463. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005

Voutilainen M.H., Bäck S., Peränen J., Lindholm P., Raasmaja A., Männistö P.T., Saarma M., Tuominen R.K. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2011;228(1):99-108. DOI 10.1016/j.expneurol.2010.12.013

Wambach C.M., Patel S.N., Kahn D.A. Maternal and fetal factors that contribute to the localization of T regulatory cells during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2014;71(5):391-400. DOI 10.1111/aji.12223

Wei H., Alberts I., Li X. The apoptotic perspective of autism. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2014;36:13-18. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2014.04.004

Yang J., Siao C.J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., McGrath K., Chen Z.Y., Mark W., Tessarollo L., Lee F.S., Lu B., Hempstead B.L. Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 2009;12(2):113-115. DOI 10.1038/nn.2244

Yoo H.J., Cho I.H., Park M., Yang S.Y., Kim S.A. Association of the catechol-o-methyltransferase gene polymorphisms with Korean autism spectrum disorders. *J. Korean Med. Sci.* 2013;28(9):1403-1406. DOI 10.3346/jkms.2013.28.9.1403

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.01.2024. После доработки 11.03.2024. Принята к публикации 12.03.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):416-423

DOI 10.18699/vjgb-24-47

История, современное состояние и генетическая характеристика локальных пород крупного рогатого скота Республики Казахстан

А.К. Хамзина [1], А.А. Юрченко [2], Н.С. Юдин [2], П.Ш. Ибрагимов [1], Е.С. Усенбеков [1], Д.М. Ларкин [3]

[1] Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Королевский ветеринарный колледж, Университет Лондона, Лондон, Великобритания
dmlarkin@gmail.com

Аннотация. В этой работе мы представляем обзор истории происхождения, текущего состояния и генетических особенностей пород крупного рогатого скота (КРС) Казахстана. Отражена информация о современном состоянии разведения, в том числе о пяти наиболее популярных локальных породах: казахской белоголовой, аулиекольской, алатауской, аулиеатинской и калмыцкой – в рамках их производственной и экономической значимости. Приведен обзор генетических исследований по этим породам, направленных на выявление их уникальных характеристик, генетического разнообразия и генов, находящихся под давлением отбора, а также ДНК-маркеров экономически важных и продуктивных признаков казахстанских пород КРС. Представлены также оригинальные данные по особенностям генетической структуры казахской белоголовой и алатауской пород на основе результатов полногеномного генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов. Описаны уникальные генетические компоненты, характеризующие эти породы КРС Казахстана, и проведено их сравнение с генетической структурой популяций этих же и других пород из Российской Федерации. Структурный анализ показал, что казахская белоголовая порода содержит генетические компоненты герефордской и калмыцкой пород, а также алтайского скота. Алатауская порода имеет композитную структуру и содержит компоненты бурой швицкой, браунви, калмыцкой и голштинской пород. Результаты демонстрируют генетическое разнообразие и особенности пород КРС Казахстана, развитие и текущее состояние скотоводства в стране, а также подчеркивают необходимость более детальных исследований для выявления генетических маркеров адаптации и экономически важных признаков местных пород.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; породы; история; Казахстан; генетическая характеристика; однонуклеотидный полиморфизм.

Для цитирования: Хамзина А.К., Юрченко А.А., Юдин Н.С., Ибрагимов П.Ш., Усенбеков Е.С., Ларкин Д.М. История, современное состояние и генетическая характеристика локальных пород крупного рогатого скота Республики Казахстан. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):416-423. DOI 10.18699/vjgb-24-47

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования по научным и (или) научно-техническим проектам на 2023–2025 годы (Министерство науки и высшего образования Республики Казахстан) AP19674808 «Создание генетических паспортов и изучение генетики локальных Казахстанских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного секвенирования».

History, status and genetic characteristics of native cattle breeds from the Republic of Kazakhstan

A.K. Khamzina [1], A.A. Yurchenko [2], N.S. Yudin [2], P.Sh. Ibragimov [1], Y.S. Ussenbekov [1], D.M. Larkin [3]

[1] Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan
[2] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[3] Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom
dmlarkin@gmail.com

Abstract. This work provides a comprehensive review of the history, status, and genetic characteristics of cattle breeds in Kazakhstan. The current breeding status is analysed, including information on popular breeds such as Kazakh white-headed, Auliekol, Alatau, Aulieata, and Kalmyk, their production and economic significance. An overview of genetic studies using DNA fingerprinting, microsatellites, and SNPs aimed at identifying unique characteristics, genetic diversity, and genes under selection, as well as markers of economically important and productive traits of Kazakh cattle breeds, is also provided. The study examined the genetic structure of the Kazakh white-headed and Alatau breeds based on whole-genome SNP genotyping. Unique genetic components characterizing Kazakhstan cattle breeds were described, and comparisons were made with genetic data from other breeds. Structural analysis showed that the Ka-

© Хамзина А.К., Юрченко А.А., Юдин Н.С., Ибрагимов П.Ш., Усенбеков Е.С., Ларкин Д.М., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

zakh white-headed breed contains genetic components of the Hereford, Kalmyk, and Altai cattle. The Alatau breed has a composite structure, containing components of the Brown Swiss, Braunvieh, Kalmyk, and Holstein breeds. The results not only reveal the genetic diversity and characteristics of cattle breeds in Kazakhstan and the historical development and current state of animal husbandry in the country, but also emphasize the importance of further research to identify adaptive and unique genetic markers affecting economically important traits of local breeds.

Key words: cattle; breeds; history; Kazakhstan; genetic characteristics; single nucleotide polymorphism.

For citation: Khamzina A.K., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Ibragimov P.Sh., Ussenbekov Y.S., Larkin D.M. History, status and genetic characteristics of native cattle breeds from the Republic of Kazakhstan. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):416-423. DOI 10.18699/vjgb-24-47

Введение

Более 10 000 лет крупный рогатый скот (КРС) является важным элементом сельского хозяйства и производства продуктов питания (Аргынбаев, 1969; Дахшлейгер, 1980). Первые упоминания о скотоводстве на территории Казахстана относятся к ботайской культуре эпохи бронзы (III–II в. до н. э.). Изучение костных останков свидетельствует о том, что стада включали в себя в основном лошадей, но также были обнаружены и останки мелкого и крупного рогатого скота (Adilova, Ilyassov, 2018). В последующий период (с XV по XVII в.) в Казахском ханстве отмечается разведение КРС в ограниченных количествах (Ratchnevsky, 1993; Allsen, 2001). До второй половины XIX–начала XX в. казахи занимались по большей части кочевой формой ведения сельского хозяйства (Фризен, 2022). Кочевое скотоводство имело экстенсивный характер, при котором использовались обширные пастбищные территории, а не интенсивные методы ведения сельского хозяйства на ограниченной территории. Использовались пастбища, где скот находился круглый или почти круглый год на подножном естественном корме. Это определяло и состав стада, которое могло включать только животных, способных тебеневать (питаться подножным кормом зимой) (Диаров, 1963; Аргынбаев, 1969). В первую очередь это были лошади и овцы, составлявшие большую часть стада кочевников (Диаров, 1963; Толыбеков, 1971). В XIX в. из-за социоэкономических изменений начали развиваться и новые формы хозяйства, такие как полукочевое скотоводство и земледелие.

Отличительной чертой полукочевого скотоводства было то, что оно совмещалось с земледелием (Толыбеков, 1971). Сенокос и занятие земледелием связаны с увеличением доли КРС в кочевом хозяйстве казахов. КРС стал основной тяговой силой при таком ведении хозяйства. Еще одно обстоятельство, способствовавшее разведению КРС в Казахстане, – это появление рынка для сбыта мяса (Толыбеков, 1971).

Казахстан – обширная центральноазиатская страна, известная своими разнообразными ландшафтами от степей до гор, сформировала породы КРС, отвечающие конкретным потребностям человека и адаптированные к местным условиям окружающей среды. Казахские породы КРС разводили таким образом, чтобы они могли обитать в суровых, зачастую экстремальных условиях этой страны, при этом обладали достаточно высокой продуктивностью (Диаров, 1963).

Современные местные породы КРС характеризуются своей адаптируемостью, устойчивостью и способностью обеспечивать население необходимыми ресурсами, такими как мясо, молоко и шкуры (Казкенова, Айнаканова, 2016). Эти породы – важнейшее достояние Казахстана и всего мира. Поэтому необходимо изучать их уникальную генетику для последующего улучшения, а также для создания новых коммерческих пород, способных сохранять выдающиеся свойства в суровом резко континентальном степном климате Казахстана и других стран.

В настоящей работе проведен обзор литературы, описывающей современные породы КРС Казахстана, их коммерческие свойства и генетические особенности, а также представлены данные по генетической структуре популяций двух пород, казахской белоголовой и алатауской, по результатам полногеномного генотипирования образцов этих пород из Казахстана и Российской Федерации и их сравнения с другими породами.

Текущий статус, ареал распространения и описание пород

По данным Бюро национальной статистики Республики Казахстан, на 1 марта 2023 г. (www.stat.gov.kz) общая численность скота в регионах составляет свыше 10 млн голов (рис. 1). Этот показатель выше данных предыдущих лет и свидетельствует о положительной динамике роста на ~4 % в год.

В стране разводят 23 породы КРС, зарегистрированные в информационно-аналитической системе Казахстана (www.plem.kz), включая четыре породы, которые получены в результате скрещивания завезенных пород с местным скотом и хорошо приспособлены к суровым климатическим условиям региона (алатауская, аулиеатинская, казахская белоголовая и аулиекольская) (Диаров, 1963; Тореханов и др., 2006). Эти породы имеют уникальные особенности, такие как адаптация к суровым климатическим условиям (экстремальные температуры) и ограниченному доступу к кормам (Тореханов и др., 2011), устойчивость к местным болезням и паразитам (Sattarova et al., 2023), высокая мясная и молочная продуктивность в условиях страны (Тореханов и др., 2011). Для создания этих пород использованы породы, ввезенные в Казахстан из других стран для улучшения экономических характеристик местного скота или адаптации к новым условиям содержания и выращивания (Kazhgaliyev et al., 2016; Zhumanov, Baimukanov, 2020; Улимбашев и др., 2023).

Основные импортированные породы, которые теперь успешно разводят в Казахстане, включают: калмыцкую породу, ангусов, герефордов, голштинскую, холмогорскую, лимузин, санта-гертруду и другие. По данным Республиканской палаты молочных и комбинированных пород КРС Казахстана (www.qazaqsut.kz), куда входят

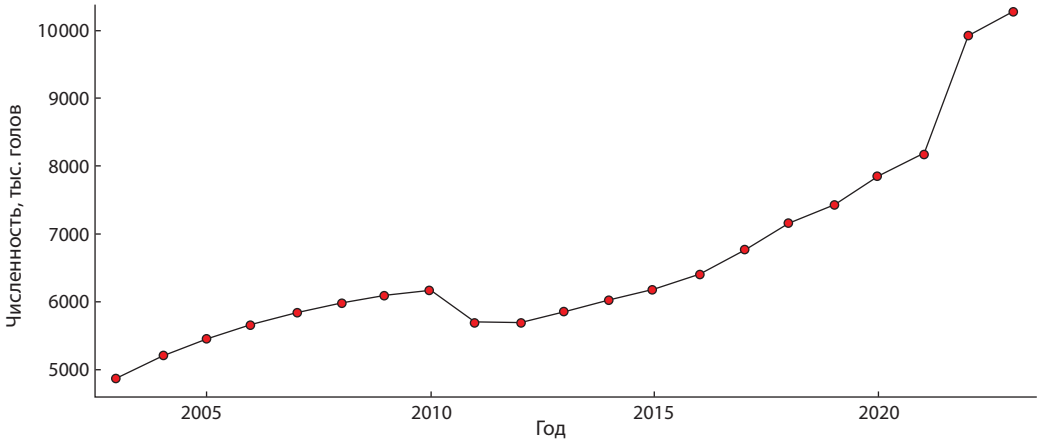


Рис. 1. Общая численность КРС в Республике Казахстан с 2003 по 2023 г. (www.stat.gov.kz).

Рис. 2. Породы крупного рогатого скота: *а* – алатауская; *б* – аулиеатинская; *в* – казахская белоголовая; *г* – аулиекольская; *д* – калмыцкая.

алатауская, аулиеатинская, голштинская, черно-пестрая и другие породы этого направления продуктивности, количество племенных заводчиков на 2023 г. составляет 628 хозяйств, а количество товарных – 1271 хозяйство. Большая часть численности скота молочного и комбинированного направления продуктивности приходится на симментальскую и голштинскую породы.

Алатауская порода КРС – мясомолочного направления продуктивности (рис. 2, *а*). Работа по выведению этой породы проводилась в 1930–1950 гг. в Киргизской ССР и южных областях Казахской ССР путем скрещивания местного скота с животными костромской и швицкой пород (Нысанбаев, 2004). Животные этой породы приспособлены к обитанию в высокогорных районах; масть в основном бурая, разных оттенков. По состоянию на начало 2024 г. популяция племенного скота этой породы составляет около 7 тыс. голов, что на ~2.8 % выше предыдущего года (www.qazaqsut.kz). Эта порода преимущественно разводится в Алматинской и Туркестанской областях страны (www.gov.kz).

Алатауская порода КРС из Казахстана была предметом ряда исследований, направленных на улучшение ее разведения и выращивания. Так, A.D. Baimukanov с коллегами (Baimukanov et al., 2021) сосредоточились на эффективном

разведении казахстанской популяции, в то время как С.К. Абугалиев с коллегами (2020) исследовали рост и развитие телок при различных технологиях выращивания.

Аулиеатинская порода – молочного направления продуктивности (см. рис. 2, *б*), была выведена в Киргизской и Казахской ССР путем скрещивания местного скота с голландским и последующего разведения помесей «в себе» (Нысанбаев, 2004), впервые была апробирована в 1952 г. Отличительная особенность породы – приспособленность к разведению в условиях жаркого климата и устойчивость к кровопаразитарным заболеваниям. Масть животных преимущественно черно-пестрая, встречается и светло-серая. Животные этой породы хорошо откармливаются. Порода характеризуется молочным типом телосложения, хорошо развитым выменем, правильно поставленными конечностями (Нысанбаев, 2004). На 2024 г. в Казахстане численность племенного скота аулиеатинской породы составляет около 1 тыс. голов (www.qazaqsut.kz), с основным разведением на юге страны (www.gov.kz).

Казахская белоголовая порода – мясного направления продуктивности, была выведена в СССР в 1930–1940 гг. (см. рис. 2, *в*), а официально она апробирована в 1950 г. Селекцию проводили путем сложного воспроизводительного скрещивания маточного поголовья местного казахского и частично калмыцкого скота с быками герефордской породы, в результате чего скот приобрел лучшие качества всех этих животных: высокую адаптационную способность, крепость конституции, скороспелость и большой выход мяса (Porter, 2016). Масть животных красная, различной интенсивности, с белыми головой, грудью, брюхом, нижней частью конечностей и кистью хвоста. Бывают животные с белыми отметинами на холке и крестце, передняя часть развита лучше задней; волосяной покров густой и короткий летом, а зимой длинный, чуть курчавый (Dmitriev, Ernst, 1989; Нысанбаев, 2004). Общая численность племенного скота казахской белоголовой породы на 2022 г. составляла около 500 тыс. голов, в том числе около 200 тыс. коров (www.gov.kz). Порода разводится по всей стране, но наиболее многочисленная популяция находится в Восточно-Казахстанской области. Казахская белоголовая порода КРС вносит значительный вклад в производство говядины в Казахстане (Bozymov, 2018).

Аулиекольская порода создана путем сложного воспроизводительного скрещивания трех специализированных мясных пород: казахской белоголовой, шаролезской и абердин-ангусской (см. рис. 2, *г*). В соответствии с международной классификацией относится к крупным породам мясного скота. Зарегистрирована в 1992 г. (Нысанбаев, 2004). Порода районирована преимущественно в Костанайской области, осуществлялся также завоз в хозяйства Павлодарской, Северо-Казахстанской, Алматинской и Карагандинской областей. По состоянию на 2022 г. численность племенного скота аулиекольской породы составляла около 70 тыс. голов, из них приблизительно 33 тыс. коров (www.gov.kz). Специализированная мясная аулиекольская порода характеризуется хорошей скороспелостью, высоким выходом и качеством мяса, высокой энергией роста, приспособленностью к местным условиям. Масть животных – светло-серая, 70 % поголовья – комолые. Животные имеют крепкую конституцию, зимой обрастают густым волосяным покровом и хорошо приспособлены к суровым природно-климатическим условиям, резко континентальному климату (Нысанбаев, 2004). Летом они быстро нагуливаются, легко переносят жару, а зимой не боятся морозов, находясь вне помещений.

Калмыцкая порода – мясного направления продуктивности, разводится в Казахстане с XVII в. (см. рис. 2, *д*). Она была привнесена кочевыми калмыцкими племенами более 350 лет назад из западной части Монголии и Китая (Бичурин, 1991; www.qalmaq.kz). Окончательное формирование калмыцкой породы происходило в условиях кочевого хозяйства при круглогодичном пастбищном содержании животных. Коровы калмыцкой породы, как правило, средних размеров и компактного телосложения (Нармаев, 1963). Масть животных красная, с белыми отметинами на голове, брюхе или конечностях. В зимний период коровы калмыцкой породы обрастают густой шерстью. На 2022 г. общая численность племенного скота калмыцкой породы составляла около 23 тыс. голов, в том числе около 15 тыс. коров. Калмыцкую породу преимущественно разводят в Жамбылской и Туркестанской областях Казахстана (www.gov.kz).

Калмыцкая порода КРС, относящаяся к группе туранo-монгольских пород (Yurchenko et al., 2018a), обладает высокими адаптивными способностями и сходными производственными и репродуктивными характеристиками с монгольской породой (Fedotova et al., 2020). Производительность калмыцких бычков варьирует в зависимости от методов разведения, при этом бычки калмыцкой породы бурятской селекции отличаются более высокой живой массой по сравнению с бычками калмыцкой и ростовской селекции (Лумбунов, Гармаев, 2021).

Генетическая характеристика пород КРС Казахстана

Молекулярно-генетические исследования казахстанских пород КРС до настоящего времени проводили с использованием ДНК-фингерпринтинга, микросателлитов, SNP-маркеров. Эти ДНК-маркеры обладают высокой информативностью и вариабельностью для изучения генетического разнообразия. Однако в большинстве случаев в анализ включается достаточно ограниченное число маркеров, что не обеспечивает полного анализа генома животных.

Структура популяции. Анализ генотипов трех пород КРС Казахстана (Терлецкий и др., 2019), алатауской, казахской белоголовой и аулиекольской, выполняли методом ДНК-фингерпринтинга с использованием ДНК-зондов, которые выявили высокую степень генетического сходства животных аулиекольской породы (BS = 0.64), у алатауской породы (BS = 0.54), и наименьшую – у казахской белоголовой породы (BS = 0.51). Генетическое расстояние между казахской белоголовой и аулиекольской породами было наименьшим (D = 0.025), что подтверждает их известное генетическое родство. Алатауская порода демонстрировала наивысшее расстояние от казахской белоголовой и аулиекольской пород (D = 0.055 и 0.060 соответственно). Значения гетерозиготности (H) выше у казахской белоголовой породы (0.54), что превышает значение у аулиекольской (0.38), подтверждая более высокую генетическую вариабельность первой породы (Терлецкий и др., 2019).

Анализ 12 микросателлитных локусов показал родство казахской белоголовой породы с породой герефорд, что связано с использованием быков герефордской породы для ее создания (Shamshidin et al., 2019; Abdelmanova et al., 2021). Это подтверждается и данными полногеномного генотипирования 154 тыс. SNP-маркеров, животные казахской белоголовой породы российской селекции образовали кластер как при анализе главных компонент (PCA), так и при структурном и филогенетическом анализе с породой герефорд (Yurchenko et al., 2018b; Юдин, Ларкин, 2019; Beishova et al., 2022a). Однако при этом казахская белоголовая порода обладала высоким уровнем генетического разнообразия и сохранила заметную долю тураномонгольских генетических компонентов, которые, скорее всего, имеют происхождение от местного казахского скота и калмыцкой породы.

Кластеризация SNP-маркеров выявила генетическое родство алатауской породы с костромской, бурой швицкой и породой браунви, что подтверждает известную историю формирования алатауской и костромской пород (Юдин, Ларкин, 2019). Из аллелей микросателлитов, обнаруженных у музейного калмыцкого скота, более 80 % присутствовали и у современных представителей породы (Abdelmanova et al., 2021).

В результате полногеномного генотипирования SNP-маркеров было установлено генетическое родство между калмыцкой породой и сербской породой буша (Iso-Touru et al., 2016). В свою очередь, аулиекольская порода проявила гетерогенность при использовании SNP-генотипирования 154 тыс. маркеров, формируя собственный кластер генетического разнообразия в анализе главных компонент (PCA) и структурном анализе (ADMIXTURE) (Beishova et al., 2022a).

Были также изучены распределение и частота участков гомозиготности (ROH) в геномах казахской белоголовой и аулиекольской пород КРС (Beishova et al., 2022b). В этом исследовании обнаружено, что казахская белоголовая порода имела большее количество ROH (55.976) по сравнению с аулиекольской породой (13.137). Расчет средней длины ROH показал различия между значениями у казахской белоголовой (211.59±92.98 Мб) и аулиекольской (99.62±46.48 Мб) пород.

Гены под давлением отбора. При анализе генетических следов селекции у казахской белоголовой породы были идентифицированы районы генов *KIT*, *KITLG* и *EDN3*, ассоциированные с белой, чалой окраской шерсти и фенотипом «белая голова» соответственно (Юдин, Ларкин, 2019). Анализ частот гаплотипов данных полногеномного генотипирования показал, что у казахской белоголовой породы наблюдаются сигналы на хромосоме 6, в районе генов *LCORL-NCAPG*, ассоциированном с рядом признаков роста у КРС (среднесуточный привес, развитие мышц и признаки туши). Обнаружен отбор и в интервале на хромосоме 14, содержащем ген *DGAT1*, который вносит вклад в жирность молока.

Ген *FKBP2*, ассоциированный с выходом и содержанием белка в молоке, также оказался в районе под отбором у казахской белоголовой породы. У калмыцкой породы районы под отбором находились в области гена *HMGA2*, который ассоциируется с ростом у КРС, и гена *TRPV5*, связанного с гипокальциемией и послеродовым парезом у КРС (Yurchenko et al., 2018b). У калмыцкой породы, а также у других российских пород обнаружено, что ген *RAD52* подвергался давлению отбора. Этот ген связан с репарацией ДНК и участвует в процессах противовирусной защиты (Юдин, Ларкин, 2019).

Генетические маркеры экономически важных признаков. Анализ ассоциации генотипов по генам кальпаина (*CAPN1*) и соматотропного гормона (*GH*) с признаками продуктивности выявил, что животные казахской белоголовой породы, гомозиготные по локусам *CAPN1* (CC) и *GH* (VV), достоверно превосходят животных без аллелей C и V по таким признакам, как «молочная продуктивность», «среднесуточный прирост массы тела», «предубойная масса тела», «убойная масса», «масса туши», «масса мякоти», «химический состав и гистологические показатели мяса» (Plakhtukova et al., 2020). Генетические маркеры, такие как антигены групп крови A1, A2, D′, W, V и Z, были идентифицированы у калмыцкой породы, что потенциально может иметь значение для селекции и разведения (Chimidova et al., 2022).

Исследование коров аулиеатинской породы в Южном Казахстане в сравнении с другими породами обнаружило высокую встречаемость у животных гена каппа-казеина (*к-Cn*, *CSN3*) с генотипами AB и BB, а также более частую встречаемость аллеля B, важного для сыроделия. Филогенетический анализ выявил, что животные аулиеатинской породы наиболее близки к немецкому черно-пестрому скоту и входят с ним в общий кластер. Хотя аллели черно-пестрой породы редки у аулиеатинской породы, они положительно коррелируют с уровнем удоев за 305-дневный период лактации (Алентаев, 2010).

Популяционно-генетический анализ казахской белоголовой и алатауской пород

Для проведения этого анализа были использованы образцы крови алатауской породы (40 особей) из ТОО «Какпатас» Жамбылской области; 53 образца крови казахской белоголовой породы из крестьянского хозяйства «Агро Балтабай» Алматинской области; 25 образцов волосяных луковиц получены в крестьянском хозяйстве «Елимай» Восточно-Казахстанской области. Генотипирование образцов ДНК казахской белоголовой и алатауской пород проводили с использованием биочипа BovineSNP50 v.3 (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя в ООО «Мираторг-Генетика». Результаты генотипирования этих двух пород казахстанской селекции были объединены с данными генотипирования алтайского скота и близкородственных пород из России (Yurchenko et al., 2018a) с помощью программы PLINK v. 1.9 (Purcell et al., 2007). Структурный анализ объединенных данных генотипирования 389 особей выполняли с помощью программы fastSTRUCTURE (Raj et al., 2014).

Анализ генетической структуры (рис. 3) популяций казахской белоголовой и алатауской пород КРС казахстанской селекции в контексте этих пород из России и близких пород показывает разделение групп пород на две основные популяции при заданном количестве популяций K = 2.

В первую группу входит герефордская порода, а во вторую – бурая швицкая порода. Остальные породы

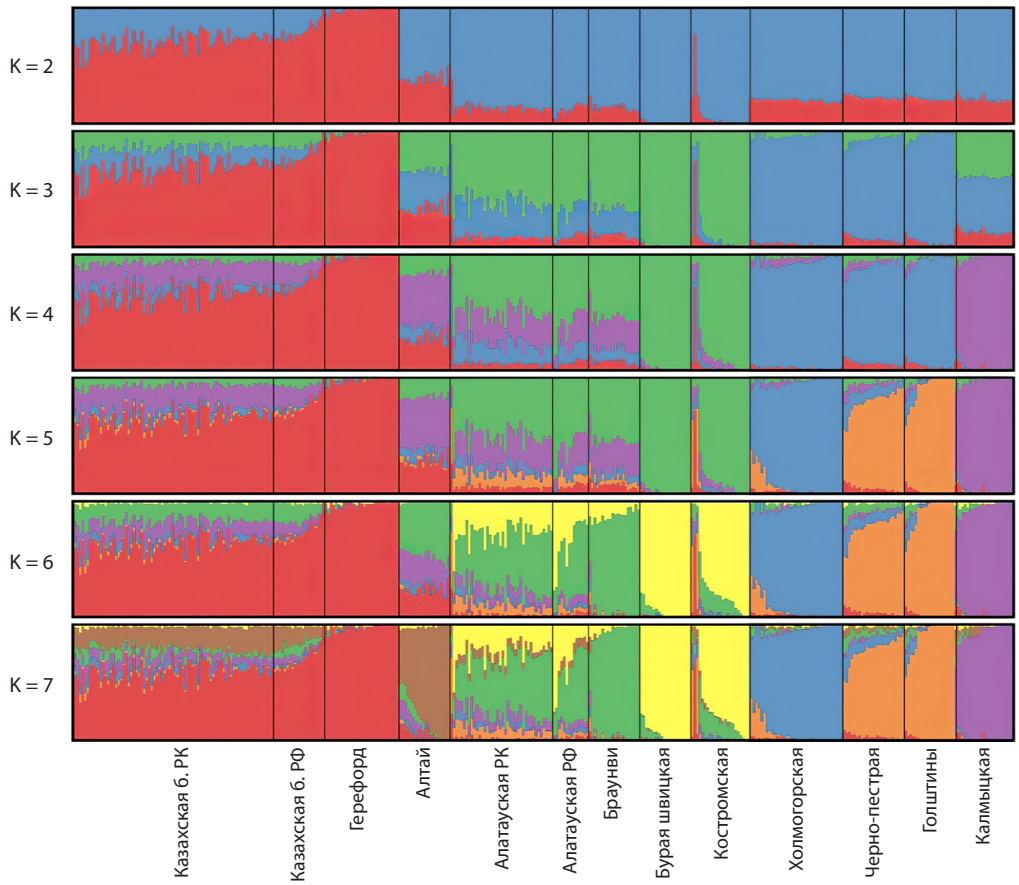


Рис. 3. Генетическая структура казахстанских и других евразийских пород КРС.

Казахская б. РК – казахская белоголовая порода из Республики Казахстан; Казахская б. РФ – казахская белоголовая порода из Российской Федерации; Алтай – алтайский скот; Алатауская РК – алатауская порода из Республики Казахстан; Алатауская РФ – алатауская порода из Российской Федерации. Показаны результаты кластеризации популяций программой fastSTRUCTURE от K = 2 до K = 7.

имеют преимущественно либо компоненты герефордов (казахская белоголовая российской и казахстанской селекций), либо компоненты бурой швицкой (алтайский скот, холмогорская, черно-пестрая, голштины, калмыцкая, алатауская казахстанской и российской селекций, браунви, костромская).

При K = 3 появляется компонент бурой швицкой и костромской пород, который выделяет группу близких пород (бурая швицкая, костромская, браунви и алатауская порода казахстанской и российской селекций). Становится отчетливым кластер молочных пород: холмогорской, черно-пестрой и голштинов. Алтайский скот и калмыцкая порода выглядят как гибридные популяции. При K = 4 калмыцкая порода формирует отдельный кластер, ее уникальный компонент прослеживается у казахской белоголовой породы, алтайского скота, а также алатауской породы и браунви. При K > 5 этот компонент у породы браунви исчезает. При K = 5 холмогорская порода отделяется от общего кластера с голштинами и черно-пестрой породой. При K = 6 обнаруживается структура алатауской породы, которая является композитной и имеет компоненты бурой швицкой (костромской), браунви, калмыцкой и голштинской (черно-пестрой) пород.

Близость к костромской и швицкой породам, по-видимому, объясняется происхождением алатауской породы. Животные алатауской породы казахстанской селекции имеют чуть более выраженный компонент голштинского скота и калмыцкой породы по сравнению с российской популяцией. Поголовье казахстанской селекции этой породы увеличилось с ~500 до 7 тыс. голов за последние 10 лет. Таким образом, наблюдаемые различия могут объясняться эффектом «бутылочного горлышка» и генетическим дрейфом. При K = 7 алтайский скот формирует отдельный кластер, компонент которой присутствует у казахской белоголовой породы. Таким образом, казахская белоголовая имеет выраженный компонент герефордской породы, калмыцкого и алтайского скота. Алтайский скот, вероятно, близок по генетике к исконному казахскому скоту, использованному при получении казахской белоголовой породы. Казахская белоголовая порода казахстанской селекции в среднем имеет меньший компонент герефордов и больший компонент алтайского и калмыцкого скота по сравнению с казахской белоголовой породой российской селекции.

В последнее десятилетие в Казахстане проводится активная работа по учету и сохранению локальных пород скота, включая казахскую белоголовую породу (www.aqbas.kz). Одной из целей этой программы является постепенное сокращение использования инвазивных пород при разведении локальных. Возможно, данная стратегия

снизила долю генетики герефорда в популяции казахской белоголовой породы казахстанской селекции по сравнению с популяцией из России. В целом анализ генетической структуры этих пород КРС подчеркивает важность сохранения и поддержания их генетического разнообразия для обеспечения устойчивости и адаптивности к изменяющимся условиям окружающей среды и потребностям животноводства.

Заключение

За время долгой истории животноводства в Казахстане были выведены уникальные породы, адаптированные к его климатическим и экологическим условиям, которые играют решающую роль в животноводческом секторе страны. Молекулярно-генетические исследования показывают их близость не только с европейскими породами, но и с группой турано-монгольских пород. Недавние работы по ДНК-фингерпринтингу, микросателлитам и SNP-маркерам демонстрируют, что КРС Казахстана необходимо исследовать более детально для выявления адаптационных и уникальных генетических маркеров экономически важных признаков местных пород. Наиболее перспективными подходами могут быть полногеномное секвенирование основных пород КРС Казахстана и сравнение с геномами пород со всего мира. Акцент на сохранении генетического разнообразия казахстанских пород КРС согласуется с глобальными усилиями по поддержанию биоразнообразия локальных популяций домашних животных.

Список литературы / References

Абугалиев С.К., Бупебаева Л.К., Байбатырова М.А., Маткеримов Н.К., Маткеримова К.Г. Рост и развитие телок алатауской породы при разных технологиях выращивания. *Главный зоотехник*. 2020;(6):43-49. DOI 10.33920/sel-03-2006-06
[Abugaliev S.K., Bupebaeva L.K., Baybatyrova M.A., Matkerimov N.K., Matkerimova K.G. The growth and development of heifers of Alatau breed at different technologies of rearing. *Glavnyj Zootekhnik = Head of Animal Breeding*. 2020;(6):43-49. DOI 10.33920/sel-03-2006-06 (in Russian)]

Алентаев А. Повышение эффективности селекции аулиеатинского скота с использованием мирового генофонда в условиях Южного Казахстана. Шымкент, 2010
[Alentayev A. Increase of the Efficiency of Aulieata Cattle Breeding in Southern Kazakhstan by Using the World Gene Pool. Shymkent, 2010 (in Russian)]

Аргынбаев Х. Қазақтың мал шаруашылығы жайында этнографиялық очерк (Этнографические очерки по скотоводству казахов). Алматы, 1969
[Argynbayev Kh. Ethnographic Essays on Kazakh Cattle Breeding. Almaty, 1969 (in Kazakh)]

Бичурин Н.Я. Историческое обозрение ойратов или калмыков с XV столетия до настоящего времени. Элиста, 1991
[Bichurin N.Ya. Historical Overview of the Oirats, or Kalmyks, from the 15th Century to the Present. Elista, 1991 (in Russian)]

Бюро национальной статистики Казахстана. Официальный сайт. Доступно по: www.stat.gov.kz
[Bureau of National Statistics of Kazakhstan. Official Site. Available at: www.stat.gov.kz]

Дахшлейгер Г. Хозяйство казахов на рубеже XIX–XX веков: Материалы к историко-этнографическому атласу. Алма-Ата, 1980
[Dakhshleyger G. Economy of the Kazakhs at the Turn of the 19th–20th Centuries: Materials for the Historical and Ethnographic Atlas. Alma-Ata, 1980 (in Russian)]

Диаров К. Животноводство Казахстана. Алма-Ата, 1963
[Diarov K. Livestock Farming in Kazakhstan. Alma-Ata, 1963 (in Russian)]

Казкенова А., Айнаканова Б. Современное состояние молочного скотоводства Монголии и Республики Казахстан. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*. 2016;14(1):125-129. DOI 10.5564/mjas.v14i1.592
[Kazkenova A., Ainakanova B. Current state of dairy cattle breeding in Mongolia and the Republic of Kazakhstan. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*. 2016;14(1):125-129. DOI 10.5564/mjas.v14i1.592 (in Russian)]

Лумбунов С.Г., Гармаев Б.Д. Мясная продуктивность бычков калмыцкой породы разной селекции. *Главный зоотехник*. 2021;(11):31-46. DOI 10.33920/sel-03-2111-04
[Lumbunov S.G., Garmaev B.D. Beef productivity of differently bred steers of the Kalmyk breed. *Glavnyj Zootekhnik = Head of Animal Breeding*. 2021;(11):31-46. DOI 10.33920/sel-03-2111-04 (in Russian)]

Нысанбаев А.Н. Казахстан. Национальная энциклопедия. Алматы, 2004
[Nysanbaev A.N. Kazakhstan. National Encyclopedia. Almaty, 2004 (in Russian)]

Республиканская палата калмыцкой породы. Официальный сайт. Доступно по: www.qalmaq.kz
[The Republican Chamber of the Kalmyk Breed. Official site. Available at: www.qalmaq.kz]

Республиканская палата молочных и комбинированных пород КРС. Официальный сайт. Доступно по: www.qazaqsut.kz
[The Republican Chamber of Dairy and Combined Breeds of Cattle. Official site. Available at: www.qazaqsut.kz]

Республиканская палата казахской белоголовой породы. Официальный сайт. Доступно по: www.aqbas.kz
[The Republican Chamber of Kazakh White-Headed Cattle Breed. Official site. Available at: www.aqbas.kz]

Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Усенбеков Е.С. Генетические особенности казахских пород скота. *Эффективное животноводство*. 2019;(1):64-66. DOI 10.24411/9999-007A-2019-10015
[Terletsky V.P., Tyshchenko V.I., Usenbekov E.S. Genetic features of Kazakh cattle breeds. *Effectivnoye Zhivotnovodstvo = Efficient Livestock Farming*. 2019;(1):64-66. DOI 10.24411/9999-007A-2019-10015 (in Russian)]

Толыбеков С. Кочевое общество казахов в XVII–начале XX века. Алма-Ата, 1971
[Tolybekov S. The Nomadic Society of Kazakhs in the 17th–early 20th Centuries. Alma-Ata, 1971 (in Russian)]

Тореханов А., Каримов Ж., Даленов Ш., Найманов Д., Жазылбеков Н. Животноводство (Ірі қара шаруашылығы). Алматы, 2006
[Torekhanov A., Karimov J., Dalenov Sh., Naimanov D., Zhazilbekov N. Animal Husbandry. Almaty, 2006 (in Kazakh)]

Тореханов А., Мусабаев Б., Таджиев К., Карымсаков Т. Научные достижения в области животноводства. Алматы, 2011
[Torekhanov A., Musabaev B., Tadzhiev K., Karymsakov T. Scientific Achievements in Animal Husbandry. Almaty, 2011 (in Russian)]

Улимбашев М.Б., Гостева Е.Р., Краснова О.А., Коник Н.В., Тлецерук И.Р. Состояние мясных породных ресурсов крупного рогатого скота России (обзор). *Генетика и разведение животных*. 2023;(1):52-64. DOI 10.31043/2410-2733-2023-1-52-64
[Ulimbashev M., Gosteva E., Krasnova O., Konik N., Tletseruk I. Condition of meat breed resources of cattle in Russia (review). *Genetika i Razvedenie Zhivotnykh = Genetics and Breeding of Animals*. 2023;(1):52-64. DOI 10.31043/2410-2733-2023-1-52-64 (in Russian)]

Фризен Д.Я. К проблеме развития скотоводства и земледелия среди казахского населения Западно-Казахстанского региона на рубеже XIX–XX веков. *Вестн. Тюмен. гос. ун-та. Гуманитарные исследования. Humanitates*. 2022;8(1):241-252. DOI 10.21684/2411-197X-2022-8-1-241-252

[Frizen D.Ya. On the problem of the development of cattle breeding and agriculture among the Kazakhs in the Western Kazakhstan at the turn of the XIX–XX centuries. *Vestnik Tyumenskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Gumanitarnye Issledovaniya*. *Humanitates = Tyumen State University Herald. Humanities Research. Humanitates*. 2022;8(1):241-252. DOI 10.21684/2411-197x-2022-8-1-241-252 (in Russian)]

Электронное правительство Республики Казахстан. Министерство сельского хозяйства. Официальный сайт. Доступно по: www.gov.kz
[The Electronic Government of the Republic of Kazakhstan. Ministry of Agriculture. Official site. Available at: www.gov.kz]

Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Происхождение, селекция и адаптация российских пород крупного рогатого скота по данным полногеномных исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(5):559-568. DOI 10.18699/VJ19.525
[Yudin N.S., Larkin D.M. Whole genome studies of origin, selection and adaptation of the Russian cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):559-568. DOI 10.18699/VJ19.525 (in Russian)]

Abdelmanova A.S., Kharzinova V.R., Volkova V.V., Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Boronetskaya O.I., Chinarov R.Y., Brem G., Zinovieva N.A. Analysis of genetic diversity of Kazakh white-headed cattle breed by microsatellites compare with ancestral breeds. In: Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Biological Diversity, Ecology and Evolution, 15–31 March 2021. Basel, Switzerland: MDPI, 2021;9487. DOI 10.3390/BDEE2021-09487

Adilova A.K., Ilyassov Sh.A. Development of cattle breeding in Kazakhstan in the Bronze Age. *Bull. Karaganda Univ*. 2018;1(89):8-13

Allsen T.T. Culture and Conquest in Mongol Eurasia. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. DOI 10.1017/CBO9780511497445

Baimukanov A.D., Artykovich Y.Y., Alexandrovich D.V., Amkhatovich M.T., Ablgazinovich A.K. Efficient breeding in Kazakhstan Alatau cattle breed population. *Am. J. Anim. Vet. Sci*. 2021;16(4):318-326. DOI 10.3844/ajavsp.2021.318.326

Beishova I., Dossybayev K., Shamshidin A., Belaya A., Bissembayev A., Khamzin K., Kovalchuk A., Nametov A. Population analysis and genetic structure of two Kazakh cattle breeds using 150K SNP. *HAYATI J. Biosci.* 2022a;29(3):301-309. DOI 10.4308/hjb.29.3.301-309

Beishova I., Dossybayev K., Shamshidin A., Belaya A., Bissembayev A., Khamzin K., Kovalchuk A., Nametov A. Distribution of homozygosity regions in the genome of Kazakh cattle breeds. *Diversity*. 2022b;14(4):279. DOI 10.3390/d14040279

Bozymov K. Zonal type of Kazakh white-headed breed of cattle in West Kazakhstan. Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, 2018

Chimidova N.V., Moiseikina L., Ubushieva A.V., Khakhlinov A.I., Kedeeva O. Genetic structure of population of the Kalmyk breed cattle. *E3S Web Conf*. 2022;363:03025. DOI 10.1051/e3sconf/202236303025

Dmitriev N.G., Ernst L.K. (Eds.). Animal Genetic Resources of the USSR. Rome: FAO of the United Nations, 1989

Fedotova G.V., Slozhenkina M.I., Tsitsige, Natyrov A.K., Erendzhenova M.V. Comparative analysis of economic and biological features of Kalmyk and Mongolian cattle breeds. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci*. 2020;548(8):082076. DOI 10.1088/1755-1315/548/8/082076

Iso-Touru T., Tapio M., Vilkki J., Kiseleva T., Ammosov I., Ivanova Z., Popov R., Ozerov M., Kantanen J. Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe. *Anim. Genet*. 2016;47(6):647-657. DOI 10.1111/age.12473

Kazhgaliyev N.Z., Shauyenov S.K., Omarkozhauly N., Shaikenova K.H., Shurkin A.I. Adaptability and productive qualities of imported beef cattle under the conditions of the Northern region of Kazakhstan. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*. 2016;13(1):531-538. DOI 10.13005/bbra/2065

Plakhtukova V., Selionova M.I., Gladkikh M.Y., Kuznetsova O.V. Association of CAPN1 and GH genes with productivity traits in Kazakh Whiteheaded cattle. *E3S Web Conf*. 2020;224:04027. DOI 10.1051/e3sconf/202022404027

Porter V., Alderson L., Hall S.J., Sponenberg D.P. Mason's world encyclopedia of livestock breeds and breeding. Volume 1 and Volume 2. CABI, 2016. DOI 10.1079/9781845934668.0000

Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., 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

Raj A., Stephens M., Pritchard J.K. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics*. 2014;197(2):573-589. DOI 10.1534/genetics.114.164350

Ratchnevsky P. Genghis Khan: His Life and Legacy. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 1993

Sattarova R., Shynybaev K., Bakiyeva F., Strochkov V., Boranbayeva K., Zhanserkenova O., Kassymbekova S., Ibadullayeva A., Khamzina A. Metagenomic analysis and identification of epizootic strains of the causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis in Kazakhstan. *Int. J. Vet. Sci*. 2023;12(6):822-831. DOI 10.47278/journal.ijvs/2023.071

Shamshidin A.S., Kharzhau A., Baimukanov D.A., Sermyagin A.A. Molecular genetic profile of Kazakhstan populations of cattle breeds. *Bull. Natl. Acad. Sci. Republic Kazakhstan*. 2019;6(382):154-162. DOI 10.32014/2019.2518-1467.157

Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity*. 2018a;120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3

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*. 2018b;8(1):12984. DOI 10.1038/s41598-018-31304-w

Zhumanov K., Baimukanov A. Dairy productivity of cows of the Holstein black-and-white cattle of the Kazakhstan population. *Rep. Natl. Acad. Sci. Republic Kazakhstan*. 2020;(6):109-114

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила в редакцию 21.03.2024. После доработки 16.04.2024. Принята к публикации 16.04.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):424-432

DOI 10.18699/vjgb-24-48

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2* и *CAT*, участвующих в процессах репарации ДНК и антиоксидантной защите, с риском развития рака молочной железы

А.А. Тимофеева [1] ✉, В.И. Минина [1, 2], А.В. Торгунакова [1, 2], О.А. Соболева [1], Р.А. Титов [1, 2], Я.А. Захарова [1, 2], М.Л. Баканова [1], А.Н. Глушков [1]

[1] Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Россия
[2] Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия
✉ annateam86@gmail.com

Аннотация. Онкологические заболевания молочной железы – одна из ведущих причин смертности у женщин. Рак молочной железы относится к числу распространенных мультифакториальных полигенных заболеваний, реализующихся в результате сочетанного взаимодействия генетических и средовых факторов. Наиболее часто встречаются люминальные опухоли. Люминальный подтип В рака молочной железы характеризуется худшим прогнозом и ранними рецидивами. Для изучения генетических факторов риска развития злокачественных новообразований молочной железы необходимо определить полиморфные варианты генов, играющих важную роль в канцерогенезе, к числу которых относятся гены репарации ДНК и системы антиоксидантной защиты. Изучены ассоциации полиморфизмов генов *hOGG1* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPD* (rs13181), *SOD2* (rs4880) и *CAT* (rs1001179) у 313 некурящих пациенток в постменопаузе с диагнозом люминального подтипа В Her2-негативного рака молочной железы. В контрольную группу вошли 233 здоровые некурящие женщины в постменопаузе. Зарегистрированы с поправкой на возраст статистически значимые ассоциации полиморфных вариантов генов *XPD* (rs13181) и *APEX1* (rs1130409) с риском развития люминального подтипа В Her2-негативного рака молочной железы в лог-аддитивной модели наследования, гена *CAT* (rs1001179) – в доминантной модели (OR = 1.41; CI 95 %: 1.08–1.85; Padj = 0.011; OR = 1.39; CI 95 %: 1.07–1.81; Padj = 0.013 и OR = 1.70; CI 95 %: 1.19–2.43; Padj = 0.004 соответственно). В группе женщин пожилого возраста (60–74 года) выявлена ассоциация вариантов гена *CAT* (rs1001179) с риском развития рака молочной железы в лог-аддитивной модели наследования (OR = 1.87; CI 95 %: 1.22–2.85; Padj = 0.0024). С помощью MDR-анализа найдена оптимальная статистически значимая 3-локусная модель межгенных взаимодействий при развитии онкозаболеваний молочной железы люминального подтипа В. MDR-анализ показал также тесное взаимодействие и взаимное усиление эффектов между локусами *APEX1* и *SOD2* и независимость эффектов данных локусов от эффекта локуса *CAT* при формировании люминального подтипа В рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы; люминальный подтип В; *hOGG1*; *APEX1*; *XPD*; *SOD2*; *CAT*.

Для цитирования: Тимофеева А.А., Минина В.И., Торгунакова А.В., Соболева О.А., Титов Р.А., Захарова Я.А., Баканова М.Л., Глушков А.Н. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2* и *CAT*, участвующих в процессах репарации ДНК и антиоксидантной защите, с риском развития рака молочной железы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):424-432. DOI 10.18699/vjgb-24-48

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А21-121011590009-9 «Иммуно-гормональные взаимодействия при раке молочной железы» и с использованием средств гранта на создание молодежной лаборатории (постановление правительства Кемеровской области № 632 от 19 сентября 2022 г.).

Polymorphic variants of the *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2*, and *CAT* genes involved in DNA repair processes and antioxidant defense and their association with breast cancer risk

A.A. Timofeeva [1] ✉, V.I. Minina [1, 2], A.V. Torgunakova [1, 2], O.A. Soboleva [1], R.A. Titov [1, 2], Ya.A. Zakharova [1, 2], M.L. Bakanova [1], A.N. Glushkov [1]

[1] Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russia
[2] Kemerovo State University, Kemerovo, Russia
✉ annateam86@gmail.com

© Тимофеева А.А., Минина В.И., Торгунакова А.В., Соболева О.А., Титов Р.А., Захарова Я.А., Баканова М.Л., Глушков А.Н., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. Breast cancer is one of the leading causes of mortality among women. The most frequently encountered tumors are luminal tumors. Associations of polymorphisms in the *hOGG1* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPD* (rs13181), *SOD2* (rs4880), and *CAT* (rs1001179) genes were studied in 313 nonsmoking postmenopausal patients with luminal B subtype breast cancer. The control group consisted of 233 healthy nonsmoking postmenopausal women. Statistically significant associations of the *XPD* and *APEX1* gene polymorphisms with the risk of developing luminal B Her2-negative subtype of breast cancer were observed in a log-additive inheritance model, while the *CAT* gene polymorphism showed an association in a dominant inheritance model (OR = 1.41; CI 95 %: 1.08–1.85; Padj = 0.011; OR = 1.39; CI 95 %: 1.07–1.81; Padj = 0.013 и OR = 1.70; CI 95 %: 1.19–2.43; Padj = 0.004, respectively). In the group of elderly women (aged 60–74 years), an association of the *CAT* gene polymorphism with the risk of developing luminal B subtype of breast cancer was found in a log-additive inheritance model (OR = 1.87; CI 95 %: 1.22–2.85; Padj = 0.0024). Using MDR analysis, the most optimal statistically significant 3-locus model of gene-gene interactions in the development of luminal B Her2-negative subtype breast cancer was found. MDR analysis also showed a close interaction and mutual enhancement of effects between the *APEX1* and *SOD2* loci and the independence of the effects of these loci from the *CAT* locus in the formation of luminal B subtype breast cancer.
Key words: breast cancer; luminal B subtype; *hOGG1*; *APEX1*; *XPD*; *SOD2*; *CAT*.

For citation: Timofeeva A.A., Minina V.I., Torgunakova A.V., Soboleva O.A., Titov R.A., Zakharova Ya.A., Bakanova M.L., Glushkov A.N. Polymorphic variants of the *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2*, and *CAT* genes involved in DNA repair processes and antioxidant defense and their association with breast cancer risk. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):424-432. DOI 10.18699/vjgb-24-48

Введение

Злокачественные новообразования молочной железы входят в группу наиболее распространенных онкологических патологий, занимая по количеству смертей у женщин второе место в мировой статистике (Siegel et al., 2021). К факторам риска, способствующим развитию онкопатологии молочных желез, относят возраст, избыточный вес, наличие этого заболевания у родственников. Значимый вклад в развитие рака молочной железы (РМЖ) вносят генетические, репродуктивные и гормональные факторы. Наиболее часто встречаются, согласно литературным данным, гормонозависимые (люминальные) опухоли (Ignatiadis, Sotiriou, 2013). Люминальный подтип В рака молочной железы, в отличие от люминального подтипа А рака, характеризуется худшим прогнозом и ранними рецидивами, а также более высокой частотой метастазирования в лимфоузлы (Nishimura et al., 2010).

Рак молочной железы – сложное заболевание с большой гетерогенностью. Наиболее часто изучаемыми маркерами риска наследственных форм РМЖ являются мутации таких генов, как *BRCA1/2*, *PALB2*, *TP53*. Они определяют повышение риска рака молочной железы более чем в 2 раза по сравнению с общей популяцией. Рак молочной железы, связанный с герминальными мутациями в *BRCA1*, нередко имеет тройной негативный фенотип (70–85 %), в то время как ER-положительные случаи чаще встречаются у носителей мутаций *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2* и *PALB2* (Breast Cancer Association Consortium, 2021).

Между тем большинство случаев рака молочной железы являются спорадическими (на долю наследственных форм РМЖ приходится только от 5 до 10 %). Существует потребность в значимых прогностических биомаркерах для спорадического рака молочной железы, которые позволили бы осуществлять наблюдение за лицами из группы риска, тем самым снижая связанную с этим заболеваемость и смертность.

Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS) позволил зарегистрировать свыше 170 локусов предрасположенности к развитию злокачественных новообразований молочной железы, причем наибольший вклад вносят однонуклеотидные полиморфизмы (Michailidou et al., 2017; Ferreira et al., 2019). В группе женщин европейского происхождения с помощью GWAS было идентифицировано 32 локуса, ассоциированных с риском развития РМЖ. Пять локусов показали ассоциации ($p < 0.05$) в противоположных направлениях между люминальными и нелюминальными подтипами РМЖ. Анализы *in silico* показали, что эти пять локусов содержат клеточно-специфичные энхансеры, активность которых различается между нормальными люминальными и базальными клетками молочной железы (Zhang H. et al., 2020). Значительная часть вариантов, обнаруженных с помощью подобных исследований, располагается в основном в регуляторных некодирующих областях, в частности в дистальных энхансерах и сайтах связывания факторов транскрипции (Pan et al., 2021).

Особое значение среди различных биомаркеров имеют варианты генов репарации ДНК. Повреждения ДНК, такие как окисленные и восстановленные азотистые основания, аддукты и повреждения, производимые метилирующими агентами, исправляются с помощью ферментов, входящих в систему эксцизионной репарации оснований (BER).

Ген *hOGG1* кодирует ключевой фермент BER – бифункциональную ДНК-гликозилазу/β-лиазу, удаляющую из ДНК остатки 8-оксогуанина. Один из наиболее часто изучаемых полиморфизмов гена *hOGG1* приводит к замене серина на цистеин в 326-м положении белка (rs1052133), что способствует снижению репаративной активности (Niu et al., 2012). В исследовании, проведенном на линии клеток рака молочной железы HCC1937, было показано, что данные клетки накапливают более высокие уровни 8-оксогуанина в сравнении с клетками здоровой железистой ткани (Nyaga et al., 2006).

Другим геном, участвующим в пути BER, является *APEX1*, кодирующий апуриновую/апиримидиновую эндонуклеазу, удаляющую из ДНК сайты, не содержащие оснований. Полиморфизм гена *APEX1* rs1130409, связанный с трансверсией тимина на гуанин в экзоне 5, приводит к замене аспарагиновой кислоты на глутаминовую

(Asp148Glu), что сопряжено со снижением способности фермента корректно взаимодействовать с другими белками BER, приводя к уменьшению эффективности процесса репарации в целом (Hadi et al., 2000).

Значительную роль в поддержании стабильности генома играет система эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), способная удалять все возможные повреждения ДНК (Sugasawa, 2010). Один из ключевых генов данного пути репарации ДНК – *XPD*, кодирующий геликазу, которая принимает участие в раскручивании ДНК и распознавании объемных аддуктов и димеров тимидина (Fontana et al., 2008). Замена аденина на цитозин в 2251-м (rs13181) положении гена приводит к замещению глютамином лизина в 751-м положении белка, что меняет его конфигурацию и влияет на взаимодействие с геликазным активатором (Romaniuk et al., 2014).

Важным фактором в канцерогенезе молочной железы является окислительный стресс, вызванный повышенной выработкой активных форм кислорода (АФК), избыточная продукция которых может привести к повреждению ДНК, перекисному окислению липидов и модификации белков (Caporaso, 2003; Tas et al., 2005). Эффективность работы антиоксидантных систем организма определяется индивидуальными генетическими особенностями. К числу белков, защищающих клетки от оксидативного стресса, относятся каталаза (CAT) и супероксиддисмутаза (SOD2) (Ambrosone, 2000).

Каталаза – один из ключевых ферментов, нейтрализующих АФК путем разложения перекиси водорода на воду и кислород (Ambrosone, 2000). Аллельные варианты гена, кодирующего каталазу, ассоциированы с уменьшением каталитической активности фермента. Широко изученный полиморфизм rs1001179, находящийся в области промотора гена, приводит к уменьшению экспрессии гена и падению активности фермента (Forsberg et al., 2001; Bastaki et al., 2006). В одной из работ высказано предположение о связи между воздействием эстрогена и активностью каталазы. Было показано, что обработка нормальных эпителиальных клеток молочной железы человека в культуре эстрадиолом снижает активность клеточной каталазы (Forsberg et al., 2001).

В системе антиоксидантной защиты клеток участвует также марганец-зависимая супероксиддисмутаза, экспрессирующаяся в митохондриях. Транзиция цитозина на тимин в 47-м положении гена (rs4880) приводит к замене аланина на валин в 16-м положении фермента, результатом которой являются изменение вторичной структуры сигнального пептида, дестабилизация его альфа-спирального участка. Это снижает импорт белка из цитоплазмы в матрикс митохондрий, из-за чего образуется локальный дефицит фермента. Для *T*-варианта характерна также сниженная стабильность мРНК (Sutton et al., 2005). Описана ассоциация данной замены со сверхэкспрессией гена *SOD2* и накоплением генотоксичной перекиси водорода (Ji et al., 2012).

Целью нашей работы стал анализ ассоциаций локусов *hOGG1* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPD* (rs13181), *SOD2* (rs4880) и *CAT* (rs1001179) с риском развития у женщин люминального подтипа B Her2-негативного рака молочной железы.

Материалы и методы

Всего было обследовано 2150 женщин, проживающих в Кемеровской области, с диагнозом рака молочной железы. Критерии включения пациентов в исследование: европеоиды, женский пол, возраст старше 40 лет, постменопауза, первично диагностированный люминальный подтип B Her2-негативного РМЖ, отсутствие семейной истории заболевания (нет онкобольных родственников). Критерии исключения: курение, наличие любых форм онкопатологии в анамнезе, наличие онкобольных родственников.

Из общей выборки пациентов в соответствии с принятыми критериями было отобрано 313 некурящих женщин (средний возраст 60.88 ± 0.35), из которых 42.04 % имели I стадию заболевания, 42.04 % – II стадию, у 13.38 и 2.55 % пациентов были III и IV стадии РМЖ соответственно. Метастазы в лимфоузлы и/или отдаленные органы были обнаружены у 51 женщины. Все пациенты были обследованы врачами Кузбасского клинического онкологического диспансера по полному комплексу диагностических методик, благодаря чему был определен точный патоморфологический диагноз у каждого человека. При классификации на подтипы основывались на показателях экспрессии эстрогеновых (ER) и прогестероновых (PR) рецепторов, а также рецепторной тирозинкиназы (Her2) и уровня пролиферативной активности Ki-67 (Goldhirsch et al., 2013).

В группу контроля вошли 233 жительницы Кемеровской области, не имевшие признаков онкологических заболеваний (средний возраст 58.44 ± 0.34). Критерии включения в группу контроля: европеоиды, женский пол, возраст старше 40 лет, постменопауза. Критерии исключения: курение, наличие любых форм онкопатологии в анамнезе, наличие онкобольных родственников. Возрастная характеристика обследованных групп (согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (https:/www.who.int/ru) от 2016 г.) представлена в табл. 1.

Это исследование одобрено комитетом по этике Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук и проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2000 г.). Сбор данных и образцов периферической крови осуществлялся после получения добровольного информированного согласия от участниц исследования.

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Варианты генов *hOGG1* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPD* (rs13181) и *CAT* (rs1001179), *SOD2* (rs4880) типировали методом ПЦР в реальном времени с применением технологии конкурирующих TaqMan-зондов с использованием наборов реактивов СибДНК («СибДНК», Новосибирск, Россия). Амплификацию и детекцию результатов проводили с помощью CFX96 (Bio-Rad, США).

Таблица 1. Возрастная характеристика изученных групп

Возрастная группа, лет	Больные РМЖ, *N* (%)	Контрольная группа, *N* (%)
45–59	119 (36.39)	137 (58.80)
60–74	194 (59.33)	96 (41.20)

Для статистической обработки данных использовали пакеты прикладных программ SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats) и STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Талса, Оклахома, США). Анализ частоты редкого аллеля, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (χ^2) и анализ различий между группами по частотам аллелей и генотипов осуществляли с помощью доступных онлайн-ресурсов (https://gene-calc.pl/hardy-weinberg-page и http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm соответственно). Статистически значимыми различия считали при $p < 0.05$. Для минимизации статистической ошибки первого типа применяли поправку Бонферрони на множественность сравнений. Логистический регрессионный анализ с расчетом отношения шансов (OR) и 95 % доверительных интервалов проводили с учетом возраста. Лучшую модель из всех статистически значимых определяли, используя информационный критерий Акайке (AIC), имеющий наименьшее значение. С помощью метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR), позволяющего проанализировать все возможные модели комбинаций SNP, изучали межгенные взаимодействия, при этом вклад каждого гена и/или их взаимодействия оценивался величиной H (снятой неопределенностью в терминах теории информации, энтропией) и выражался в процентах (Moore et al., 2006). Для проведения данного анализа применяли программное обеспечение MDR 3.2.0 (Computational Genetics Laboratory, Philadelphia, Pennsylvania, США).

Результаты

Изучение вариантов генов *hOGG1*, *APEX1*, *XPD*, *SOD2* и *CAT* выполнено в когортах некурящих женщин больных РМЖ люминального подтипа В и здоровых женщин близкого возраста (табл. 2).

Таблица 2. Распределение полиморфных вариантов генов репарации ДНК и антиоксидантной защиты в изученных группах

Локусы	Генотипы и аллели	РМЖ, *N* (%)	Контрольная группа, *N* (%)	*p* (df)**
XPD c.2251A>C, p.K751Q (rs13181)	*AA*	125 (39.94)	118 (50.64)	0.06 (2)/0.05 (1)
	AC	152 (48.56)	95 (40.77)	
	CC	36 (11.50)	20 (8.58)	
	A	201 (64.22)	166 (71.03)	
	C	118 (35.78)	67 (28.97)	
	p^{HWE}*	0.39	0.87	
APEX1 c.444T>G, p.D148E (rs1130409)	*TT*	107 (34.19)	96 (41.20)	0.10 (2)/0.16 (1)
	TG	157 (50.16)	114 (48.93)	
	GG	49 (15.65)	23 (9.87)	
	T	186 (59.27)	153 (65.67)	
	G	127 (40.73)	80 (34.33)	
	p^{HWE}*	0.56	0.24	
hOGG1 c.977C>G, p.S326C (rs1052133)	*CC*	185 (59.11)	142 (60.94)	0.28 (2)/0.97(1)
	CG	118 (37.70)	77 (33.05)	
	GG	10 (3.19)	14 (6.01)	
	C	244 (77.96)	181 (77.47)	
	G	69 (22.04)	52 (22.53)	
	p^{HWE}*	0.10	0.45	
CAT g.4760 C>G (rs1001179)	*CC*	168 (53.67)	151 (64.81)	0.045 (2)/0.07 (1)
	CG	119 (38.02)	69 (29.61)	
	GG	26 (8.31)	13 (5.58)	
	C	228 (72.68)	186 (79.62)	
	G	85 (27.32)	47 (20.38)	
	p^{HWE}*	0.48	0.22	
SOD2 c.47T>C, p.A16V (rs4880)	*TT*	84 (26.84)	65 (27.90)	0.24 (2)/0.41 (1)
	TC	147 (46.96)	122 (52.36)	
	CC	82 (26.20)	46 (19.74)	
	T	157 (50.32)	126 (54.08)	
	C	156 (49.68)	107 (45.92)	
	p^{HWE}*	0.30	0.71	

* Соответствие равновесию Харди–Вайнберга; ** уровень значимости при сравнении распределения частот аллелей и генотипов между исследуемыми группами.

Распределение частот аллелей и генотипов в изученных группах отвечает равновесию Харди–Вайнберга и соответствует показателям, наблюдаемым в популяциях европеоидов (http://www.ensembl.org/Homo_ sapiens). Статистически значимых различий между группами пациентов с РМЖ, разделенных по стадиям заболевания (I и II стадии против III и IV), местоположению опухоли, наличию метастаз, выявлено не было. Достоверно значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов генов репарации ДНК и антиоксидантной системы между группами пациенток с РМЖ и здоровыми женщинами с учетом поправки Бонферрони не обнаружено.

Анализ различных моделей наследования с поправкой на возраст позволил выявить ассоциацию полиморфных вариантов генов *XPD* (rs13181) и *APEX1* (rs1130409) в лог-аддитивной модели, а полиморфизма гена *CAT* (rs1001179) – в доминантной модели наследования с риском развития люминального подтипа B Her2-негативного РМЖ (OR = 1.41, CI 95 % 1.08–1.85, Padj = 0.011; OR = 1.39, CI 95 % 1.07–1.81, Padj = 0.013 и OR = 1.70, CI 95 % 1.19–2.43, Padj = 0.004 соответственно).

Распределение частот генотипов и аллелей изученных генов в разных возрастных группах пациенток с РМЖ и здоровых женщин представлено в табл. 3.

Таблица 3. Распределение полиморфных вариантов генов репарации ДНК и антиоксидантной защиты в разных возрастных группах

Возрастная группа, лет	Локусы	Генотипы и аллели	РМЖ, *N* (%)	Контрольная группа, *N* (%)	*p* (df)*
45–59	*XPD c.2251A>C*, *p.K751Q* (rs13181)	*AA/AC/CC*	49 (41.18)/52 (43.70)/18 (15.12)	68 (49.64)/56 (40.87)/13 (9.49)	0.35
		A	75 (63.03)	96 (70.08)	0.29
		C	44 (36.97)	41 (29.02)	
	APEX1 c.444T>G, *p.D148E* (rs1130409)	*TT/TG/GG*	41 (34.45)/58 (48.74)/20 (16.81)	53 (38.69)/67 (48.91)/17 (12.40)	0.68
		T	70 (58.82)	87 (63.15)	0.52
		G	49 (41.18)	50 (36.85)	
	hOGG1 c.977C>G, *p.S326C* (rs1052133)	*CC/CG/GG*	75 (63.03)/40 (33.61)/4 (3.36)	88 (64.23)/42 (30.66)/7 (5.11)	0.89
		C	95 (79.84)	109 (79.56)	0.92
		G	24 (20.16)	28 (20.44)	
	CAT g.4760 C>G (rs1001179)	*CC/CG/GG*	64 (53.78)/50 (42.02)/5 (4.20)	83 (60.58)/45 (32.85)/9 (6.57)	0.39
		C	89 (74.79)	106 (77.01)	0.74
		G	30 (25.21)	31 (22.99)	
	SOD2 c.47T>C, *p.A16V* (rs4880)	*TT/TC/CC*	29 (24.37)/61 (51.26)/29 (24.37)	30 (21.90)/69 (50.36)/38 (27.74)	0.89
		T	59 (50.00)	64 (47.08)	0.74
		C	60 (50.00)	73 (52.92)	
60–74	*XPD c.2251A>C*, *p.K751Q* (rs13181)	*TT/TG/GG*	76 (39.18)/100 (51.55)/ 18 (9.27)	50 (52.08)/39 (40.63)/7 (7.29)	0.16
		T	126 (64.96)	70 (72.40)	0.22
		G	68 (35.04)	26 (28.60)	
	APEX1 c.444T>G, *p.D148E* (rs1130409)	*TT/TG/GG*	66 (34.02)/99 (51.03)/29 (14.95)	43 (44.79)/47 (48.96)/6 (6.25)	0.08
		T	116 (59.54)	67 (69.27)	0.13
		G	78 (40.46)	29 (30.73)	
	hOGG1 c.977C>G, *p.S326C* (rs1052133)	*CC/CG/GG*	110 (56.70)/78 (40.21)/6 (3.09)	54 (56.25)/35 (36.46)/7 (7.29)	0.40
		C	149 (76.81)	72 (74.48)	0.85
		G	45 (23.19)	24 (25.52)	
	CAT g.4760C>G (rs1001179)	*CC/CG/GG*	104 (53.61)/69 (35.57)/21 (10.82)	68 (70.83)/24 (25.00)/4 (4.16)	0.02
		C	139 (71.40)	80 (83.33)	0.04
		G	55 (28.60)	16 (16.67)	
		Лог-аддитивная модель наследования (OR = 1.87, CI 95 % 1.22–2.85, Padj = 0.0024)			
	SOD2 c.47T>C, *p.A16V* (rs4880)	*TT/TC/CC*	56 (28.87)/85 (43.81)/53 (27.32)	13 (13.54)/55 (57.29)/28 (29.17)	0.02
		T	98 (50.77)	40 (42.19)	0.20
		C	96 (49.23)	56 (57.81)	

* Уровень значимости при сравнении распределения частот аллелей и генотипов между исследуемыми группами.

Таблица 4. Значимые межгенные взаимодействия при формировании РМЖ

Локусы	Tr.Bal.Acc.	Test.Bal.Acc.	Sign Test (P)	Se.	Sp.	CVC	Pre.
CAT (rs1001179), *APEX1* (rs1130409), *SOD2* (rs4880)	0.616	0.557	< 0.0001	0.473	0.752	10/10	0.799

Примечание. Tr.Bal.Acc. – тренировочная сбалансированная точность; Test.Bal.Acc. – тестируемая сбалансированная точность; Sign Test (P) – тест на значимость; Se. – чувствительность; Sp. – специфичность; CVC – повторяемость результата; Pre. (Precision) – точность модели.

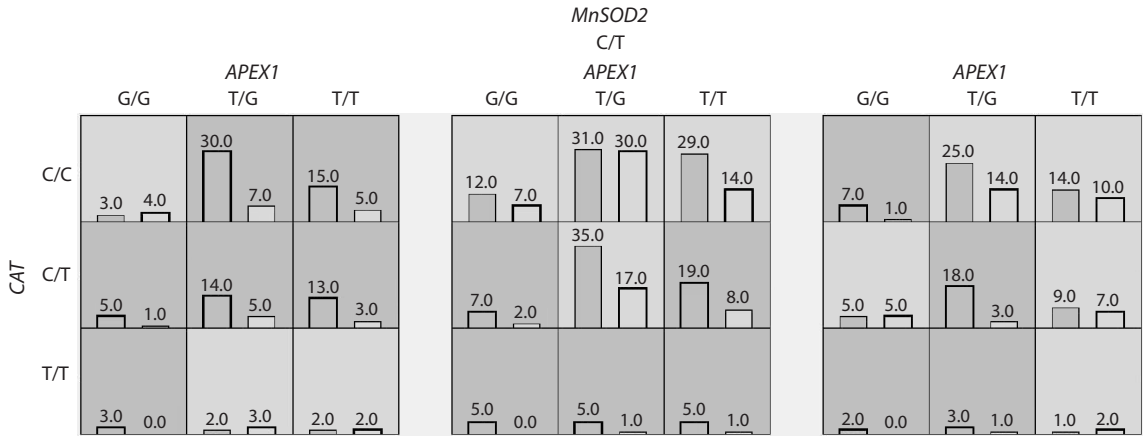


Рис. 1. Комбинации генотипов 3-локусной модели *CAT* (rs1001179), *APEX1* (rs1130409) и *SOD2* (rs4880), предрасполагающей к развитию люминального подтипа B Her2-негативного РМЖ.

Темно-серые ячейки – генотипы повышенного риска, светло-серые – генотипы пониженного риска (левые столбики в ячейках – пациентки с РМЖ, правые – здоровые женщины).

Анализ различных моделей наследования позволил обнаружить ассоциацию полиморфных вариантов гена *CAT* (rs1001179) с риском развития люминального подтипа B Her2-негативного РМЖ в группе пациенток пожилого возраста (60–74 года) в лог-аддитивной модели наследования (OR = 1.87, CI 95 % 1.22–2.85, Padj = 0.0024).

С помощью метода MDR найдена наиболее оптимальная 3-локусная модель межгенных взаимодействий, которая характеризовалась высокой точностью, минимальной ошибкой предсказания риска РМЖ и максимальной статистической оценкой воспроизводимости (табл. 4).

Анализ модели в таблицах сопряженности, представляющей собой комбинации всех возможных вариантов 3-локусной модели, выявил 12 протективных и 15 рисковых комбинаций для развития люминального подтипа B Her2-негативного РМЖ (рис. 1).

MDR-анализ показал взаимное усиление эффектов между локусами *APEX1* (rs1130409) (H = 0.07 %) и *SOD2* (rs4880) (H = 0.55 %) и независимость эффектов данных локусов от эффекта локуса *CAT* (rs1001179) (H = 0.44 %) при формировании люминального подтипа B Her2-негативного РМЖ (рис. 2).

Рис. 2. Дендрограмма межгенных взаимодействий при формировании люминального подтипа B Her2-негативного РМЖ.

Красный цвет – синергизм эффектов; коричневый – независимое взаимодействие.

Обсуждение

Чувствительность организма к воздействию вредных факторов окружающей среды зависит от корректной работы множества ферментных систем, к числу которых относятся системы репарации ДНК и антиоксидантной защиты. Весомый вклад в патогенез заболевания вносит уровень экспозиции тканей молочной железы экзо- и эндогенными эстрогенами, которые способствуют образованию объемных аддуктов ДНК (Martucci, Fishman, 1993; Hanawalt, 2002). Эстрогены влияют на регуляцию антиоксидантных ферментов, содействуют окислительным повреждениям ДНК из-за образования активных форм кислорода в процессах метаболических реакций (Tjønneland et al., 2004; Bergman et al., 2005; Silva et al., 2006; Liou, Storz, 2010).

В одной из работ были обнаружены ассоциации с риском развития РМЖ у женщин с ожирением, имеющих хотя бы один минорный аллель гена миелопероксидазы или генов репарации ДНК *GMT*, *MSH2*, *XPG* и *XRCC1* (McCullough et al., 2015). В другом исследовании показано влияние полиморфизмов генов, связанных с окислительным стрессом и репарации ДНК на выживаемость пациенток при онкозаболеваниях молочной железы (Rodrigues et al., 2012). В то же время работ, в которых изучалось бы совместное влияние полиморфизмов генов эксцизионной репарации ДНК и антиоксидантной системы на риск развития РМЖ, не найдено.

Повреждения ДНК, возникающие в результате воздействия АФК, репарируются с помощью ферментов BER- и NER-пути. Полученные в нашей работе данные ассоциации полиморфизма гена *APEX1* (rs1130409) с риском развития онкозаболеваний молочной железы согласуются с литературными данными (Mitra et al., 2008; Smith et al., 2008; Kim et al., 2013). Вместе с тем в исследовании, проведенном среди жительниц Китая, обнаружено повышение риска развития эстроген-положительного РМЖ у носительниц аллеля *444T* (Wang T. et al., 2018). Помимо репаративной, фермент обладает также окислительно-восстановительной функцией, регулируя окислительно-восстановительный статус целого ряда транскрипционных факторов (Kelley et al., 2012; Wang Z. et al., 2014). Редоксактивность белка обуславливает синергизм эффектов между локусами *APEX1* (rs1130409) и *SOD2 47* (rs4880) при формировании рака молочной железы.

Другим ключевым компонентом системы BER-пути является ген *hOGG1*. В нашем исследовании не обнаружено ассоциации полиморфизма *hOGG1* (rs1052133) с риском развития рака молочной железы. Сходные результаты были показаны и в метаанализе, выполненном M. Kamali с коллегами (2017), в котором не выявлено ассоциации аллеля *977G* с риском развития заболевания как у европейских, так и у азиатских женщин. В то же время в исследовании, проведенном среди польских пациенток, обнаружено увеличение риска развития РМЖ у женщин с генотипом *hOGG1 977GG* (Romanowicz et al., 2017).

Неоднозначны и результаты исследований, изучающих ассоциацию полиморфизма гена *XPD* (rs13181) с риском развития онкозаболеваний молочной железы. В работах, проведенных среди жительниц Канады, Бразилии и Китая, не было обнаружено ассоциации полиморфных вариантов данного гена с риском развития заболевания (Dufloth et al., 2005; Zhang L. et al., 2005; Onay et al., 2006). При обследовании пациенток Индии была найдена ассоциация аллеля *2251C* с увеличением риска развития РМЖ (Samson et al., 2011). Позднее проведенный метаанализ также показал увеличение риска развития заболевания у носительниц аллеля *2251C* в европейских популяциях и смешанных группах (Yan et al., 2014). Подобные результаты были получены при обследовании польских пациенток (Smolarz et al., 2019).

Марганец-зависимая супероксиддисмутаза является одним из важных ферментов антиоксидантной системы. Помимо своей основной функции антиоксидантной защиты, белок SOD2 имеет сайты связывания с различными факторами транскрипции, которые способствуют ее активации, а также участвуют в защите клеток от агентов, индуцирующих окислительный стресс (Alateyah et al., 2022). Результаты молекулярно-генетических исследований, отражающих ассоциацию полиморфизма гена *SOD2* (rs4880) с увеличением риска развития РМЖ, достаточно противоречивы. В проведенной нами работе не обнаружено влияния полиморфизма данного гена на риск развития злокачественных новообразований молочной железы. Схожие результаты были зарегистрированы в исследованиях, проведенных среди женщин Польши и Греции (Jablonska et al., 2015; Kakkoura et al., 2016). Среди мексиканских пациенток была выявлена ассоциация аллеля *47T* гена *SOD2* с формированием люминального подтипа А рака молочной железы, но не люминального подтипа В рака (Gallegos-Arreola et al., 2022). У иракских и тайваньских женщин также найдена ассоциация аллеля *47T* данного гена с увеличением риска развития РМЖ (Tsai et al., 2012; Jabir, Hoidy, 2018).

Результаты исследований ассоциации полиморфизма гена *CAT* (rs1001179) с риском развития РМЖ, тоже достаточно противоречивы. В ряде работ, неоднократно проводимых среди американских пациенток, показано, что женщины с генотипом *–262 CC* имеют меньший риск развития заболевания, чем те, у кого есть хотя бы одна копия аллеля *T* (Ahn et al., 2004, 2005). В нашем исследовании зарегистрированы схожие результаты. Неоднозначные данные были получены в работе Y. Li с коллегами (2009), показавшими незначительное снижение риска развития РМЖ у женщин в постменопаузе, имеющих генотип *CAT -262 CC* и потребляющих много овощей и фруктов (больше двух порций в день), при этом среди женщин с низким потреблением овощей и фруктов генотип *CAT -262 CC*, напротив, был связан с увеличением риска развития РМЖ (Li et al., 2009).

Заключение

Продемонстрировано комбинированное влияние вариантов генов репарации ДНК и антиоксидантной системы на риск развития рака молочной железы. Работа проведена среди женщин в постменопаузе; для более глубокого понимания влияния индивидуальных генетических особенностей на риск возникновения РМЖ необходимо также осуществлять исследования женщин более молодого возраста.

Для уточнения возможностей использования в разработке системы прогнозирования риска развития РМЖ у женщин полученных результатов следует провести дополнительные исследования с привлечением более обширной группы пациенток.

Список литературы / References

Ahn J., Gammon M.D., Santella R.M., Gaudet M.M., Britton J.A., Teitelbaum S.L., Terry M.B., Neugut A.I., Josephy P.D., Ambrosone C.B. Myeloperoxidase genotype, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk. *Cancer Res*. 2004;64(20):7634-7639. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-1843

Ahn J., Gammon M.D., Santella R.M., Gaudet M.M., Britton J.A., Teitelbaum S.L., Terry M.B., Nowell S., Davis W., Garza C., Neugut A.I., Ambrosone C.B. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *Am. J. Epidemiol*. 2005;162(10):943-952. DOI 10.1093/aje/kwi306

Alateyah N., Gupta I., Rusyniak R.S., Ouhtit A. *SOD2*, a potential transcriptional target underpinning CD44-promoted breast cancer progression. *Molecules*. 2022;27(3):811. DOI 10.3390/molecules27030811

Ambrosone C.B. Oxidants and antioxidants in breast cancer. *Antioxid. Redox Signal*. 2000;2(4):903-917. DOI 10.1089/ars.2000.2.4-903

Bastaki M., Huen K., Manzanillo P., Chande N., Chen C., Balmes J.R., Tager I.B., Holland N. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet. Genomics*. 2006;16(4):279-286. DOI 10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c

Bergman M., Ahnström M., Palmebäck Wegman P., Wingren S. Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene

and risk of breast cancer in young women. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2005;131(7):439-444. DOI 10.1007/s00432-004-0663-7

Breast Cancer Association Consortium. Breast cancer risk genes – association analysis in more than 113,000 women. *N. Engl. J. Med.* 2021;384(5):428-439. DOI 10.1056/NEJMoa1913948

Calculation for the Chi-Square Test [Electronic resource]. URL: http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm (accessed: 06.07.2023)

Caporaso N. The molecular epidemiology of oxidative damage to DNA and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003;95(17):1263-1265. DOI 10.1093/jnci/djg065

Dufloth R.M., Costa S., Schmitt F., Zeferino L.C. DNA repair gene polymorphisms and susceptibility to familial breast cancer in a group of patients from Campinas, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 2005; 4(4):771-782

Ensembl [Electronic resource]. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens (accessed: 06.07.2023)

Ferreira M.A., Gamazon E.R., Al-Ejeh F., Aittomäki K., Andrulis I.L., Anton-Culver H., Arason A., Arndt V., Aronson K.J., Arun B.K., ... Yang X.R., Yannoukakos D., Ziogas A., Kraft P., Antoniou A.C., Zheng W., Easton D.F., Milne R.L., Beesley J., Chenevix-Trench G. Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. *Nat. Commun.* 2019;10(1): 1741. DOI 10.1038/s41467-018-08053-5

Fontana L., Bosviel R., Delort L., Guy L., Chalabi N., Kwiatkowski F., Satih S., Rabiau N., Boiteux J.P., Chamoux A., Bignon Y.J., Bernard-Gallon D.J. DNA repair gene *ERCC2*, *XPC*, *XRCC1*, *XRCC3* polymorphisms and associations with bladder cancer risk in a French cohort. *Anticancer Res*. 2008;28(3B):1853-1856

Forsberg L., Lyrenäs L., de Faire U., Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic. Biol. Med*. 2001;30(5):500-505. DOI 10.1016/s0891-5849(00)00487-1

Gallegos-Arreola M.P., Ramírez-Patiño R., Sánchez-López J.Y., Zúñiga-González G.M., Figuera L.E., Delgado-Saucedo J.I., Gómez-Meda B.C., Rosales-Reynoso M.A., Puebla-Pérez A.M., Lemus-Varela M.L., Garibaldi-Ríos A.F., Marín-Domínguez N.A., Pacheco-Verduzco D.P., Mohamed-Flores E.A. SOD2 gene variants (rs4880 and rs5746136) and their association with breast cancer risk. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2022;44(11):5221-5233. DOI 10.3390/cimb4411 0355

Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn Y.-J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* 2013;24(9):2206-2223. DOI 10.1093/annonc/mdt303

Hadi M.Z., Coleman M.A., Fidelis K., Mohrenweiser H.W., Wilson D.M. 3rd. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(20):3871-3879. DOI 10.1093/nar/28.20.3871

Hanawalt P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 2002;21(58):8949-8956. DOI 10.1038/sj.onc.1206096

Hardy-Weinberg equilibrium [Electronic resource]. URL: https://genecalc.pl/hardy-weinberg-page (accessed: 06.07.2023)

Ignatiadis M., Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013;10(9):494-506. DOI 10.1038/nrclinonc.2013.124

Jabir F.A., Hoidy W.H. Pharmacogenetics as personalized medicine: association investigation of SOD2 rs4880, CYP2C19 rs4244285, and FCGR2A rs1801274 polymorphisms in a breast cancer population in Iraqi women. *Clin. Breast Cancer.* 2018;18(5):e863-e868. DOI 10.1016/j.clbc.2018.01.009

Jablonska E., Gromadzinska J., Peplonska B., Fendler W., Reszka E., Krol M.B., Wieczorek E., Bukowska A., Gresner P., Galicki M., Zambrano Quispe O., Morawiec Z., Wasowicz W. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of *GPX1*. *BMC Cancer*. 2015;15:657. DOI 10.1186/s12885-015-1680-4

Ji M., Tang J., Zhao J., Xu B., Qin J., Lu J. Polymorphisms in genes involved in drug detoxification and clinical outcomes of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Chinese Han breast cancer patients. *Cancer Biol. Ther*. 2012;13(5):264-271. DOI 10.4161/cbt.18920

Kakkoura M.G., Demetriou C.A., Loizidou M.A., Loucaides G., Neophytou I., Malas S., Kyriacou K., Hadjisavvas A. MnSOD and CAT polymorphisms modulate the effect of the Mediterranean diet on breast cancer risk among Greek-Cypriot women. *Eur. J. Nutr.* 2016;55(4):1535-1544. DOI 10.1007/s00394-015-0971-5

Kamali M., Kargar S., Heiranizadeh N., Zare M., Kargar Sh., Zare Shehneh M., Neamatzadeh H. Lack of any association between the Hogg1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 18 studies. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2017;18(1):245-251. DOI 10.22034/APJCP.2017.18.1.245

Kelley M.R., Georgiadis M.M., Fishel M.L. APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. *Curr. Mol. Pharmacol*. 2012;5(1):36-53. DOI 10.2174/1874467211205010036

Kim K.Y., Han W., Noh D.Y., Kang D., Kwack K. Impact of genetic polymorphisms in base excision repair genes on the risk of breast cancer in a Korean population. *Gene.* 2013;532(2):192-196. DOI 10.1016/j.gene.2013.09.069

Li Y., Ambrosone C.B., McCullough M.J., Ahn J., Stevens V.L., Thun M.J., Hong C.C. Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2009;30(5):777-784. DOI 10.1093/carcin/bgp053

Liou G.Y., Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res*. 2010;44(5):479-496. DOI 10.3109/10715761003667554

Martucci C.P., Fishman J. P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol. Ther.* 1993;57(2-3):237-257. DOI 10.1016/0163-7258(93)90057-k

McCullough L.E., Eng S.M., Bradshaw P.T., Cleveland R.J., Steck S.E., Terry M.B., Shen J., Crew K.D., Rossner P. Jr., Ahn J., Ambrosone C.B., Teitelbaum S.L., Neugut A.I., Santella R.M., Gammon M.D. Genetic polymorphisms in DNA repair and oxidative stress pathways may modify the association between body size and postmenopausal breast cancer. *Ann. Epidemiol.* 2015;25(4):263-269. DOI 10.1016/j.annepidem.2015.01.009

Michailidou K., Lindström S., Dennis J., Beesley J., Hui S., Kar S., Lemaçon A., Soucy P., Glubb D., Rostamianfar A., … García-Closas M., Schmidt M.K., Chanock S.J., Dunning A.M., Edwards S.L., Bader G.D., Chenevix-Trench G., Simard J., Kraft P., Easton D.F. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature.* 2017;551(7678):92-94. DOI 10.1038/nature24284

Mitra A.K., Singh N., Singh A., Garg V.K., Agarwal A., Sharma M., Chaturvedi R., Rath S.K. Association of polymorphisms in base excision repair genes with the risk of breast cancer: a case-control study in North Indian women. *Oncol. Res*. 2008;17(3):127-135. DOI 10.3727/096504008785055567

Moore J.H., Gilbert J.C., Tsai C.T., Chiang F.T., Holden T., Barney N., White B.C. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J. Theor. Biol*. 2006; 241(2):252-261. DOI 10.1016/j.jtbi.2005.11.036

Nishimura R., Osako T., Okumura Y., Hayashi M., Toyozumi Y., Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp. Ther. Med.* 2010;1(5):747-754. DOI 10.3892/etm.2010.133

Niu Y., Li F., Tang B., Shi Y., Yu P. Association of hOGG1 Ser326Cys polymorphism with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep*. 2012;39(6):6563-6568. DOI 10.1007/s11033-012-1485-3

Nyaga S.G., Lohani A., Jaruga P., Trzeciak A.R., Dizdaroglu M., Evans M.K. Reduced repair of 8-hydroxyguanine in the human

breast cancer cell line, HCC1937. *BMC Cancer*. 2006;6:297. DOI 10.1186/1471-2407-6-297

Onay V.U., Briollais L., Knight J.A., Shi E., Wang Y., Wells S., Li H., Rajendram I., Andrulis I.L., Ozcelik H. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. *BMC Cancer*. 2006;6:114. DOI 10.1186/1471-2407-6-114

Pan Q., Liu Y.J., Bai X.F., Han X.L., Jiang Y., Ai B., Shi S.S., Wang F., Xu M.C., Wang Y.Z., Zhao J., Chen J.X., Zhang J., Li X.C., Zhu J., Zhang G.R., Wang Q.Y., Li C.Q. VARAdb: a comprehensive variation annotation database for human. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1431-D1444. DOI 10.1093/nar/gkaa922

Rodrigues P., Furriol J., Bermejo B., Chaves F.J., Lluch A., Eroles P. Identification of candidate polymorphisms on stress oxidative and DNA damage repair genes related with clinical outcome in breast cancer patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(12):16500-16513. DOI 10.3390/ijms131216500

Romanowicz H., Pyziak Ł., Jabłoński F., Bryś M., Forma E., Smolarz B. Analysis of DNA repair genes polymorphisms in breast cancer. *Pathol. Oncol. Res*. 2017;23(1):117-123. DOI 10.1007/s12253-016-0110-5

Romaniuk O.P., Nikitchenko N.V., Savina N.V., Kuzhir T.D., Goncharova R.I. The polymorphism of DNA repair genes *XPD*, *XRCC1*, *OGG1*, and *ERCC6*, life expectancy, and the inclination to smoke. *Russ. J. Genet*. 2014;50(8):860-869. DOI 10.1134/S1022795414080067

Sambrook J., Fritsch E.R., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Samson M., Singh S.S., Rama R., Sridevi V., Rajkumar T. XPD Lys751Gln increases the risk of breast cancer. *Oncol. Lett*. 2011;2(1):155-159. DOI 10.3892/ol.2010.220

Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin*. 2021;71(1):7-33. DOI 10.3322/caac.21654

Silva S.N., Cabral M.N., Bezerra de Castro G., Pires M., Azevedo A.P., Manita I., Pina J.E., Rueff J., Gaspar J. Breast cancer risk and polymorphisms in genes involved in metabolism of estrogens (CYP17, HSD17beta1, COMT and MnSOD): possible protective role of MnSOD gene polymorphism Val/Ala and Ala/Ala in women that never breast fed. *Oncol. Rep.* 2006;16(4):781-788

Smith T.R., Levine E.A., Freimanis R.I., Akman S.A., Allen G.O., Hoang K.N., Liu-Mares W., Hu J.J. Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2008;29(11):2132-2138. DOI 10.1093/carcin/bgn193

Smolarz B., Michalska M.M., Samulak D., Romanowicz H., Wójcik L. Polymorphism of DNA repair genes in breast cancer. *Oncotarget.* 2019;10(4):527-535. DOI 10.18632/oncotarget.26568

SNPStats [Electronic resource]. URL: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats (accessed: 06.07.2023)

Sugasawa K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat. Res.* 2010;685(1-2):29-37. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.004

Sutton A., Imbert A., Igoudjil A., Descatoire V., Cazanave S., Pessayre D., Degoul F. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet. Genomics.* 2005;15(5):311-319. DOI 10.1097/01213011-200505000-00006

Tas F., Hansel H., Belce A., Ilvan S., Argon A., Camlica H., Topuz E. Oxidative stress in breast cancer. *Med. Oncol.* 2005;22(1):11-15. DOI 10.1385/MO:22:1:011

Tjønneland A., Christensen J., Thomsen B.L., Olsen A., Overvad K., Ewertz M., Mellemkjaer L. Hormone replacement therapy in relation to breast carcinoma incidence rate ratios: a prospective Danish cohort study. *Cancer*. 2004; 100(11):2328-2337. DOI 10.1002/cncr.20250

Tsai S.M., Wu S.H., Hou M.F., Chen Y.L., Ma H., Tsai L.Y. Oxidative stress-related enzyme gene polymorphisms and susceptibility to breast cancer in non-smoking, non-alcohol-consuming Taiwanese women: a case-control study. *Ann. Clin. Biochem.* 2012;49(Pt. 2):152-158. DOI 10.1258/acb.2011.011098

Wang T., Wang H., Yang S., Guo H., Zhang B., Guo H., Wang L., Zhu G., Zhang Y., Zhou H., Zhang X., Li H., Su H. Association of *APEX1* and *OGG1* gene polymorphisms with breast cancer risk among Han women in the Gansu Province of China. *BMC Med. Genet.* 2018;19(1):67. DOI 10.1186/s12881-018-0578-9

Wang Z., Ayoub E., Mazouzi A., Grin I., Ishchenko A.A., Fan J., Yang X., Harihar T., Saparbaev M., Ramotar D. Functional variants of human APE1 rescue the DNA repair defects of the yeast AP endonuclease/3′-diesterase-deficient strain. *DNA Repair.* 2014;22:53-66. DOI 10.1016/j.dnarep.2014.07.010

World Health Organization. [Electronic resource]. URL: https://www.who.int/ru (accessed: 03.10.2023)

Yan Y., Liang H., Light M., Li T., Deng Y., Li M., Li S., Qin X. *XPD* Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(3):1907-1915. DOI 10.1007/s13277-013-1256-3

Zhang H., Ahearn T.U., Lecarpentier J., Barnes D., Beesley J., Qi G., Jiang X., O'Mara T.A., Zhao N., Bolla M.K., … Kraft P., Simard J., Pharoah P.D.P., Michailidou K., Antoniou A.C., Schmidt M.K., Chenevix-Trench G., Easton D.F., Chatterjee N., García-Closas M. Genome-wide association study identifies 32 novel breast cancer susceptibility loci from overall and subtype-specific analyses. *Nat. Genet.* 2020;52(6):572-581. DOI 10.1038/s41588-020-0609-2

Zhang L., Zhang Z., Yan W. Single nucleotide polymorphisms for DNA repair genes in breast cancer patients. *Clin. Chim. Acta.* 2005;359(1-2):150-155. DOI 10.1016/j.cccn.2005.03.047

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.08.2023. После доработки 12.01.2024. Принята к публикации 26.02.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):433-442

DOI 10.18699/vjgb-24-49

Полиморфизм генов факторов регуляции ангиогенеза (*VEGF/VEGFR*), генов ремоделирования внеклеточного матрикса (*MMP/TIMP*) и уровни соответствующих белков во внеклеточных тканях пациентов с первичной и вторичной лимфедемой

В.И. Коненков, В.В. Нимаев, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
shalla64@mail.ru

Аннотация. Клетки различных органов и систем осуществляют свои функции и межклеточные взаимодействия не в инертной среде, а в микроокружении тканевых жидкостей. Нарушения нормального дренажа тканевых жидкостей сопровождают лимфедему. Важный механизм регуляции ангиогенеза и васкулогенеза в подкожной клетчатке – выработка и рецепция факторов роста эндотелия сосудов в сочетании с регуляцией матриксных металлопротеиназ. Цель настоящего исследования: сравнительный анализ полиморфизма генов фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов вместе с генами матриксных металлопротеиназ при двух формах лимфедемы; анализ взаимосвязи полиморфизма этих генов с уровнем фактора роста эндотелия сосудов и матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и пораженных тканях. Полиморфизм *VEGF* (rs699947, rs3025039), рецепторов к нему *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP2* (rs849530, rs849563, rs16837641), матриксных металлопротеиназ *MMP2* (rs2438650), *MMP3* (rs3025058), *MMP9* (rs3918242), ингибитора металлопротеиназ *Timp1* (rs6609533) и их комбинаций проанализирован методами анализа длин рестрикционных фрагментов и TaqMan RT-PCR. Уровень белков в сыворотке и тканевой жидкости определяли с использованием тест-систем ELISA. Показаны изменения частот распределения генотипов *MMP2* при первичной и *MMP3* при вторичной лимфедеме. Высокодостоверные различия частот генотипов *NRP2* обнаружены при сравнении первичной и вторичной лимфедемы. Выявлены особенности распределения «комплексных» генотипов при первичной и вторичной лимфедеме. Корреляционный анализ показал взаимозависимость концентрации исследуемых белковых продуктов MMP, TIMP и VEGF и выраженные различия в структуре корреляционных матриц пациентов с обеими формами лимфедемы. Продемонстрировано, что при первичной лимфедеме выявляются генотипы, ассоциированные с низкими значениями MMP2 и TIMP2 в сыворотке крови и тканевой жидкости, а при вторичной лимфедеме – иные связи концентраций исследуемых белков с комбинированными генетическими признаками.

Ключевые слова: лимфедема первичная; лимфедема вторичная; *VEGF*; *MMP*; *TIMP*; *KDR*; *NRP*.

Для цитирования: Коненков В.И., Нимаев В.В., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф. Полиморфизм генов факторов регуляции ангиогенеза (*VEGF/VEGFR*), генов ремоделирования внеклеточного матрикса (*MMP/TIMP*) и уровни соответствующих белков во внеклеточных тканях пациентов с первичной и вторичной лимфедемой. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):433-442. DOI 10.18699/vjgb-24-49

Polymorphism of angiogenesis regulation factor genes (*VEGF/VEGFR*), and extracellular matrix remodeling genes (*MMP/TIMP*), and the levels of their products in extracellular tissues of patients with primary and secondary lymphedema

V.I. Konenkov, V.V. Nimaev, A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
shalla64@mail.ru

Abstract. Cells of various organs and systems perform their functions and intercellular interactions not in an inert environment, but in the microenvironment of tissue fluids. Violations of the normal drainage of tissue fluids accompany lymphedema. An important mechanism of angiogenesis and vasculogenesis regulation in tissue fluids is the produc-

© Коненков В.И., Нимаев В.В., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

tion and reception of vascular endothelial growth factors in combination with the regulation of matrix metalloproteinases. The aim of the work was to perform: a comparative analysis of some polymorphisms of vascular endothelial growth factor and their receptors and the genes encoding matrix metalloproteinases in two forms of lymphedema; an analysis of the relationship of these genes' polymorphisms with the levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases and their inhibitors in serum and affected tissues. Polymorphism of *VEGF* (rs699947, rs3025039), *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP2* (rs849530, rs849563, rs16837641), matrix metalloproteinases *MMP2* (rs2438650), *MMP3* (rs3025058), *MMP9* (rs3918242), *Timp1* (rs6609533) and their combinations were analyzed by the Restriction Fragment Length Polymorphism method and TaqMan RT-PCR. The serum and tissue fluid levels were determined using the ELISA test system. Changes in the frequency distribution of *MMP2* genotypes in primary and *MMP3* in secondary lymphedema are shown. Significant frequency differences in *NRP2* genotypes were revealed by comparing primary and secondary lymphedema. Features of the distribution of complex genotypes in primary and secondary lymphedema were revealed. The correlation analysis revealed the interdependence of the concentrations of the MMP, TIMP and VEGF products and differences in the structure of the correlation matrices of patients with both forms of lymphedema. It was shown that, in primary lymphedema, genotypes associated with low MMP2 and TIMP2 in serum and tissue fluid are detected, while in secondary lymphedema, other associations of the production levels with combined genetic traits are observed.

Key words: primary lymphedema; secondary lymphedema; *VEGF*; *MMP*; *TIMP*; *KDR*; *NRP*.

For citation: Konenkov V.I., Nimaev V.V., Shevchenko A.V., Prokofiev V.F. Polymorphism of angiogenesis regulation factor genes (*VEGF*/*VEGFR*), and extracellular matrix remodeling genes (*MMP*/*TIMP*), and the levels of their products in extracellular tissues of patients with primary and secondary lymphedema. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):433-442. DOI 10.18699/vjgb-24-49

Введение

Интерес исследователей к состоянию внеклеточного матрикса и погруженного в него сосудистого русла кровеносной и лимфатической систем постоянно растет. Число научных публикаций за последние 40 лет выросло более чем в 5–6 раз в год. Это связано с пониманием того, что клетки различных органов и систем, со своим сложным внутренним метаболизмом, осуществляют важнейшие функции и межклеточные взаимодействия не в инертной среде, а в постоянном микроокружении тканевых жидкостей, несущих огромное число регуляторных факторов самой разнообразной секретируемой и мембран-ассоциированной природы.

Нарушение нормального дренажа тканевых жидкостей приводит к тканевой гипоксии и разнообразным отечным синдромам, сопровождающим различные патологические изменения в диапазоне от воспаления до опухолевого роста. Яркий пример нарушения дренажа тканевой жидкости – лимфедема (Miller, 2020). Она представлена как преимущественно генетически обусловленной «первичной», так и «вторичной» формой, связанной с постмастэктомическими последствиями или хронической венозной недостаточностью (Повещенко и др., 2010; Quirion, 2010). По некоторым оценкам, от 140 до 200 млн человек во всем мире страдают лимфедемой (Forte et al., 2019). Несмотря на столь широкое распространение данного заболевания и многочисленные исследования в этой области, основными методами лечения являются комплексная физическая противоотечная терапия и пожизненное поддерживающее использование компрессионного трикотажа (Vignes, 2017; Executive Committee…, 2020). Один из факторов такой, условно говоря, патогенетической терапии, на наш взгляд, – отсутствие четких представлений о сосудистых нарушениях в функционировании кровеносного и лимфатического русла и их взаимодействие с внеклеточным матриксом, приводящее к препятствованию физиологического оттока тканевой жидкости в пораженных регионах.

Важнейший механизм регуляции ангиогенеза и васкулогенеза в подкожной клетчатке – продукция и рецепция системы факторов роста сосудистого эндотелия VEGF, представленных VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PGF, и семейства рецепторов VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3 (Flt-4) к ним (Vaahtomeri et al., 2017; Rauniyar et al., 2018). Их взаимодействие обеспечивает рост, ремоделирование и функционирование кровеносной и лимфатической систем. Гены этих белков являются полиморфными, что оказывает влияние на уровень их экспрессии, аффинности и функциональной активности (Luo et al., 2019; Yap et al., 2019).

Как установлено, лиганд VEGF-A связывается и передает сигналы через рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2, тогда как VEGF-B – исключительно через VEGFR-1, а VEGF-C и VEGF-D обладают высокой аффинностью к VEGFR-3. Кроме того, существует два рецептора нейропилина, представляющие собой трансмембранные гликопротеины, функционирующие на оси VEGF-VEGFR. Нейропилин-1 (NRP-1), некиназный корецептор для VEGFR-2, функционирует для усиления связывания и передачи сигналов, определенных изоформ VEGF-A, а NRP-2 – некиназный корецептор для VEGFR-3 (Mucka et al., 2016; Stevens, Oltean, 2019; Gao Y. et al., 2020). Понимание генетических механизмов, лежащих в основе эндотелиального апоптоза и лимфангиогенеза, позволит пролить свет на роль нарушения этих процессов в развитии хронического воспаления и трансформации соединительной ткани при лимфедеме (Saik et al., 2019).

Непосредственно с процессами ангиогенеза и активностью регуляторных факторов роста сосудистого эндотелия связано семейство матриксных металлопротеиназ (MMP). Активность этих тканевых ферментов контролируется системой их тканевых ингибиторов (TIMP) (Cabral-Pacheco et al., 2020). Кодирующие их гены также обладают широким полиморфизмом, а белковые продукты экспрессированы на лимфатических эндотелиальных клетках и

деградируют коллаген эндотелиальной выстилки сосудов (Detry et al., 2012). Ранее получены многочисленные данные о влиянии полиморфизма генов регуляторных факторов на экспрессию и продукцию клетками (Watson et al., 2000; Gao X. et al., 2019).

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ полиморфизма генов фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов вместе с генами матриксных металлопротеиназ при двух формах лимфедемы и оценка взаимосвязи полиморфизма этих генов с уровнем фактора роста эндотелия сосудов и матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и пораженных тканях.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование были включены пациенты с подтвержденным диагнозом лимфедемы конечностей. Набор пациентов осуществлялся на базе НИИ клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ) в период с января 2017 г. по ноябрь 2018 г. Выборка 174 пациента (18–81 год, медиана 52 года) разделена на первичную (72 человека) и вторичную лимфедему конечностей (102 человека). Разделение групп на первичную и вторичную лимфедему основано на этиологических признаках согласно клиническим рекомендациям (Executive Committee…, 2020).

Критериями первичной лимфедемы конечностей считались: развитие клинических проявлений без связи с такими этиологическими факторами, как удаление лимфатических узлов, лучевая терапия, травма или хирургическое вмешательство в проекции лимфатических коллекторов, а также появление клинически значимого отека вследствие однократного эпизода рожи, считающегося провоцирующим фактором на фоне недостаточности функционального резерва лимфатического региона. Выборка пациентов со вторичной лимфедемой включала пациентов с поражением как верхних, так и нижних конечностей. Большинство пациентов со вторичной лимфедемой верхних конечностей перенесли комплексное лечение рака молочной железы (66 пациенток – 97.1 %); у двух пациентов причиной отека верхней конечности стало комбинированное лечение лимфосаркомы всех групп периферических лимфоузлов и средостения IIIA стадии, лимфогранулематоза с поражением шейных и подмышечных лимфатических узлов. Появление отека после неоднократных рецидивов рожи относили ко вторичной поствоспалительной лимфедеме.

Все пациенты, включенные в исследование, не имели прогрессирования или рецидива злокачественной опухоли, относились к 3-й клинической группе диспансерного наблюдения. По классификации Международного общества лимфологов преобладала вторая стадия заболевания. Третья стадия заболевания составляла 7 % в группе первичной лимфедемы и 8.9 % – в группе вторичной лимфедемы. Информированное согласие на участие в исследовании было подписано каждым участником исследования. Протокол клинического исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИКЭЛ (первичный протокол No 127 от 13.01.2017). Забор сыворотки крови и интерстициальной жидкости проводили в утренние часы, натощак у пациентов, поступивших в клинику НИИКЭЛ для проведения курса комплексной противоотечной терапии, до его начала. Пациенты с текущей или недавно перенесенной рожей в исследование не включались (табл. 1).

Группу сравнения составили 339 человек, сопоставимые по полу и возрасту, жители Новосибирской области. Родственники ни в группы пациентов, ни в группу сравнения не включались.

Генотипирование *VEGF-2578* (rs699947) и *MMP9-1562* (rs3918242) осуществляли методом рестриктного анализа продуктов амплификации. Структура праймеров, эндонуклеазы рестрикции и размер полученных продуктов указаны в табл. 2.

Полиморфизм генов *VEGF+936* (rs3025039), *NRP2 13581* (rs849530), *NRP2 68279* (rs849563), *NRP2 92646*

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с первичной и вторичной лимфедемой

Клинические параметры	Вторичная лимфедема (*n* = 102)	Первичная лимфедема (*n* = 72)	*P*
Возраст (Me)	58 [51; 65]	40 [30; 59]	*P* < 0.001
Ж	97 (96.1 %)	53 (74.6 %)	*P* < 0.001
М	4 (3.9 %)	18 (25.4 %)	*P* < 0.001
ИМТ (Me)	32.9 [28.6; 38.6]	27 [24.1; 39.3]	*P* = 0.04
Продолжительность заболевания (мес.) (Me)	56.5 [20.5; 132.3]	192 [84; 300]	
Возраст начала заболевания (Me)	51.5 [44.59]	25 [15.5; 33.5]	*P* < 0.001
Рожа в анамнезе	51 (51 %)	32 (45.1 %)	*P* = 0.54
ГБ	47 (46.5 %)	13 (18.3 %)	*P* < 0.001
СД 2-типа	19 (18.6 %)	11 (15.5 %)	*P* = 0.685
Гипотиреоз	16 (15.7 %)	4 (5.6 %)	*P* = 0.053
ИБС	7 (6.9 %)	3 (4.2 %)	*P* = 0.529
Остеохондроз	14 (13.7 %)	2 (2.8 %)	*P* = 0.016
ХВН	2 (2 %)	1 (1.4 %)	*P* = 1.000

Примечание. Me – медиана; в квадратных скобках указан интерквартильный размах; в круглых скобках – проценты.

Таблица 2. Генотипирование методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Полиморфная позиция	Структура праймеров	Эндонуклеаза рестрикции	Продукты гидролиза, п. н.	
			Аллель «дикого» типа	Минорный аллель
MMP9-1562 C→T	5′ GCCTGGCACATAGTAGGCCC 3′ 5′ CTTCCTAGCCAGCCGGCATC 3′	*Sph I*	435	247; 188
VEGFA-2578 C→A	5′ GGGCCTTAGGACACCATACC 3′ 5′TGCCCCAGGGAACAAAGT 3′	*Bgl II*	267	208; 60

(rs16837641), *KDR 17693* (rs10020464), *KDR 14011* (rs11133360), *MMP2-1306* (rs2438650), *MMP3-1171* (rs3025058), *Timp1* (rs6609533) анализировали ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan-зондов («Синтол», Россия) на амплификаторе «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Иммуноферментный анализ. Количественное определение фактора роста эндотелия сосудов, металлопротеиназ и их ингибиторов осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием стандартизованных наборов ELISA (нг/мл) согласно инструкции Human VEGF (Quantikine ELISA, R&D Systems, США) MMP-3 (AESKU Diagnostics, Германия), TIMP-3 (Brand Owner CLOUD-CLONE CORP., США), MMP-2 и TIMP-2 (Quantikine ELISA, R&D Systems, США) на автоматическом фотометре для планшетов ELx800 (BioTek, Тайвань).

Математический анализ данных. Статистическую обработку выполняли с помощью специализированного пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23 (США) и пакета программ объемной обработки биоинформации, включая многомерный генетический анализ. При статистическом анализе результатов генетического исследования рассчитывали частоту встречаемости аллелей, генотипов и их полилокусных комбинаций, отношение шансов (OR), 95 % доверительный интервал для OR (OR's 95 % CI).

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Уровень значимости различий частот распределения генетических признаков в сравниваемых группах определяли по двустороннему критерию точного метода Фишера для четырехпольных таблиц с учетом поправки Бонферрони. Учитывая, что распределение большинства изученных количественных признаков было отличным от нормального, применяли методы непараметрической статистики. Межгрупповые различия оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни и ANOVA Краскела–Уоллиса. Внутригрупповые различия оценивали с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона для связанных выборок. Для анализа силы и направления корреляционной связи между парами признаков применяли метод ранговой корреляции Спирмена.

Описание количественных переменных представлено в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (интервал между 25-м [Q 0.25] и 75-м [Q 0.75] процентилями). Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных параметров проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка и критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Математическую обработку связи генетических признаков с количественными лабораторными показателями осуществляли в соответствии с методическими подходами квантильного анализа. При данном подходе в качестве параметров повышенной концентрации показателей принимали диапазоны выше p75 (верхний квартиль, Q3), а сниженной – ниже p25 (нижний квартиль, Q1). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05.

Результаты

Анализ распределения изучаемых комплексных генетических признаков среди пациентов с первичной лимфедемой выявил целый ряд выраженных отличий от условно «нормального» распределения, установленного нами при исследовании значительной группы здоровых лиц без признаков лимфатических отеков конечностей. При анализе степени различий отдельных вариантов исследуемых генетических параметров они установлены лишь для одного полиморфизма гена *MMP2-1306*, связанного с преобладанием среди пациентов варианта *C* ($p = 0.029$). Наряду с этим при анализе частоты встречаемости комбинированных генетических признаков, включающих полиморфные варианты генов и *MMP*, и *VEGF*, отмечаются значительно более выраженные различия при сравнении групп пациентов с первичной лимфедемой и здоровых лиц (табл. 3).

В основном эти различия связаны с возрастанием в группе пациентов практически всех рассмотренных признаков с уровнем достоверности различий в интервале от 0.048 до 0.001 согласно двустороннему критерию точного метода Фишера. При этом такие варианты, как сочетания генотипов *VEGF-2578 CA*: *VEGF+936 TT*: *MMP9-1562 CT* и сочетания генотипов *VEGF-2578 CA*: *VEGF+936 TT*: *MMP2-1306 CC*: *MMP9-1562 CT*, ни разу не обнаружены среди представителей значительной группы здоровых лиц и выявлены исключительно среди пациентов с первичной лимфедемой. С известной долей вероятности их можно отнести к генетическим маркерам конституциональной предрасположенности индивида к развитию первичной лимфедемы. При дальнейших исследованиях предполагается проверка этой гипотезы.

При проведении подобного анализа со вторичной лимфедемой, при развитии которой большее значение имеют анатомические факторы, возникающие при оперативном повреждении лимфатических и кровеносных путей оттока тканевой жидкости, мы получаем отличную от предыдущей группы картину. В этой группе пациентов уже не об-

Таблица 3. Частота распределения отдельных и комплексных генотипов *MMP* и *VEGF* среди пациентов с первичной и вторичной лимфедемой

Комбинации генов	Генотипы	Пациенты с лимфедемой	Группа сравнения		OR*	OR's 95 % CI	P(tmF_2)
			n (%)	*N*			
Первичная лимфедема (*N* = 72 чел.)							
VEGF-2578:VEGF+936:MMP9-1562	*CA-TT-CT*	2(2.78)	0(0.00)	339	14.37	1.47–140.12	0.0303
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	*CA-TT-CC-CT*	2(2.78)	0(0.00)	288	12.21	1.25–119.15	0.0396
VEGF+936:MMP9-1562	*TT-CT*	3(4.17)	2(0.58)	346	7.48	1.23–45.60	0.0379
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	*CA-CC-CC-6A6A*	10(13.89)	2(2.35)	85	6.69	1.42–31.65	0.0127
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171:MMP9-1562	*CA-CC-CC-6A6A-CC*	8(11.11)	2(2.35)	85	5.19	1.06–25.27	0.0445
VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	*CC-5A5A-CC*	15(20.83)	6(6.82)	88	3.60	1.32–9.83	0.0104
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	***CA-CC-CC-CC***	**22(30.56)**	**39(13.54)**	288	**2.81**	**1.53–5.14**	**0.0013**
MMP3-1171:MMP9-1562	*5A5A-CC*	16(22.22)	9(10.23)	88	2.51	1.03–6.08	0.0488
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306	***CA-CC-CC***	27(37.50)	60(20.62)	291	**2.31**	**1.33–4.02**	**0.0051**
VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	***CC-CC-CC***	**31(43.06)**	**75(25.51)**	294	**2.21**	**1.29–3.77**	**0.0055**
VEGF+936:MMP2-1306	*CC-CC*	41(56.94)	120(40.40)	297	1.95	1.16–3.28	0.0121
MMP2-1306	*CC*	51(70.83)	182(57.05)	319	1.83	1.05–3.18	0.0338
VEGF-2578:VEGF+936:MMP9-1562	*CA-CC-CC*	27(37.50)	84(24.78)	339	1.82	1.06–3.12	0.0399
VEGF-2578:MMP2-1306:MMP9-1562	*CA-CC-CC*	24(33.33)	66(21.64)	305	1.81	1.03–3.17	0.0453
MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-CC*	37(51.39)	117(37.62)	311	1.75	1.05–2.94	0.0338
VEGF-2578:VEGF+936	*CA-CC*	35(48.61)	123(35.76)	344	1.70	1.02–2.84	0.0457
Вторичная лимфедема (*N* = 102 чел.)							
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-CC-TT-CC*	4(3.92)	1(0.35)	288	11.71	1.29–106.07	0.0178
VEGF-2578:VEGF+936:MMP9-1562	*AA-CT-CT*	4(3.92)	2(0.59)	339	6.88	1.24–38.11	0.0277
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306	*CC-CC-TT*	4(3.92)	2(0.69)	291	5.90	1.06–32.70	0.0416
VEGF-2578:MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-TT-CC*	5(4.90)	4(1.31)	305	3.88	1.02–14.73	0.0475
VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	*CC-5A5A-CC*	20(19.80)	6(6.82)	88	3.37	1.29–8.84	0.0110
MMP3-1171:MMP9-1562	*5A5A-CC*	23(22.77)	9(10.23)	88	2.59	1.13–5.95	0.0314
VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	*CC-CC-5A5A*	22(21.78)	9(10.23)	88	2.44	1.06–5.64	0.0478
VEGF+936:MMP3-1171	*CC-5A5A*	31(30.69)	15(17.05)	88	2.16	1.07–4.33	0.0408
VEGF-2578:VEGF+936:MMP9-1562	*CA-CC-CT*	15(14.71)	26(7.67)	339	2.08	1.05–4.09	0.0496
MMP3-1171	*5A5A*	35(34.65)	18(20.45)	88	2.06	1.07–99.00	0.0353
MMP9-1562	*CT*	37(36.27)	97(25.00)	388	1.71	1.07–2.72	0.0252
VEGF+936:MMP2-1306	*CC-CC*	53(51.96)	120(40.40)	176	1.60	1.01–2.51	0.0490
VEGF+936:MMP9-1562	*CT-CC*	9(8.82)	59(17.05)	297	0.47	0.22–0.99	0.0421
MMP2-1306:MMP3-1171:MMP9-1562	*TC-5A6A-CC*	7(6.93)	15(17.05)	88	0.36	0.14–0.94	0.0401
VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	*CC-TC-6A6A*	1(0.99)	8(9.09)	88	0.10	0.01–0.82	0.0131

Примечание. Группа сравнения для первичной и вторичной формы лимфедемы *N* = 339 чел.; OR – отношение шансов; OR's 95 % CI – 95 % доверительный интервал для OR; P(tmF_2) – уровень статистической значимости (*p*) различий по точному методу Фишера (двусторонняя).
* Данные в таблице отсортированы по убыванию величины OR. Жирным шрифтом выделены достоверные различия при $p < 0.01$.

наруживаются ассоциативные связи развития заболевания с вариантами гена *MMP2*, а выявляются отклонения от «нормального» распределения вариантов генов *MMP3* и *MMP9* в анализируемых сайтах. Отмечено преобладание *MMP3-1171 5A5A* и *MMP9-1562 CT* генотипов. Частота комбинаций этих гомозиготных генотипов также в два раза выше среди пациентов относительно контрольной группы.

Включение в анализ вариантов гена *VEGF* увеличивает степень различий между группой пациентов и контроля. Так, частота комбинированного генетического признака, представленного сочетанием гомозиготных вариантов

Таблица 4. Сравнительный анализ распределения отдельных и комплексных генотипов анализируемых генов между группами с первичной и вторичной лимфедемой

Комбинации полиморфизмов генов	Генотипы	Первичная лимфедема			Вторичная лимфедема			OR*	OR's 95 % CI	$P(tmF_2)$	P_cor
		n	*N*	%	*n*	*N*	%				
NRP2 13581:NRP2 92646:KDR 14011	*TT-GG-TC*	9	72	12.50	0	102	0.00	16.09	2.01–128.72	0.0003	0.0065
MMP3-1171:NRP2 13581:NRP2 92646	*6A6A-TT-GG*	9	72	12.50	1	101	0.99	14.29	1.77–115.49	0.0018	0.0432
MMP2-1306:MMP3-1171:NRP2 13581:NRP2 92646	*CC-6A6A-TT-GG*	8	72	11.11	0	101	0.00	14.12	1.75–114.10	0.0007	0.0354
MMP2-1306:NRP2 13581:NRP2 92646:KDR 17693	*CC-TT-GG-CC*	8	72	11.11	1	102	0.98	12.63	1.54–103.34	0.0040	0.1760
MMP2-1306:NRP2 13581:NRP2 92646:KDR 14011	*CC-TT-GG-TC*	7	72	9.72	0	102	0.00	12.48	1.53–102.13	0.0017	0.0851
NRP2 68279:NRP2 13581	*CC-TT*	7	72	9.72	0	102	0.00	12.48	1.53–102.13	0.0017	0.0156
MMP3-1171:MMP9-1562:NRP2 13581:NRP2 92646	*6A6A-CC-TT-GG*	7	72	9.72	0	101	0.00	12.36	1.51–101.15	0.0018	0.0833
MMP2-1306:NRP2 68279:NRP2 13581	*CC-CC-TT*	6	72	8.33	0	102	0.00	10.76	1.29–89.46	0.0044	0.0973
MMP9-1562:NRP2 13581:NRP2 92646:KDR 14011	*CC-TT-GG-TC*	6	72	8.33	0	102	0.00	10.76	1.29–89.46	0.0044	0.2079
VEGF+936:NRP2 13581:KDR 14011	*CT-TT-TC*	6	72	8.33	0	102	0.00	10.76	1.29–89.46	0.0044	0.0884
VEGF+936:NRP2 68279:NRP2 13581	*CC-CC-TT*	6	72	8.33	0	102	0.00	10.76	1.29–89.46	0.0044	0.0884
MMP3-1171:NRP2 13581:NRP2 92646:KDR 14011	*6A6A-TT-GG-TC*	6	72	8.33	0	101	0.00	10.66	1.28–88.59	0.0046	0.2748
MMP3-1171:NRP2 13581:NRP2 92646:KDR 17693	*6A6A-TT-GG-CC*	6	72	8.33	0	101	0.00	10.66	1.28–88.59	0.0046	0.2428
MMP9-1562:KDR 14011:FOXC2-512	*CC-TC-CT*	10	42	23.81	2	55	3.64	8.28	1.71–40.22	0.0040	0.0725
MMP2-1306:MMP3-1171:NRP2 68279:NRP2 13581	*CC-6A6A-AA-TT*	10	72	13.89	2	101	1.98	7.98	1.69–37.65	0.0042	0.2078
MMP2-1306:NRP2 13581:NRP2 92646	*CC-TT-GG*	12	72	16.67	3	102	2.94	6.60	1.79–24.34	0.0020	0.0426
MMP2-1306:MMP3-1171:NRP2 13581	*CC-6A6A-TT*	15	72	20.83	4	101	3.96	6.38	2.02–20.16	0.0008	0.0195
MMP3-1171:NRP2 13581	*6A6A-TT*	17	72	23.61	5	101	4.95	5.93	2.08–16.97	0.0004	0.0034
MMP3-1171:NRP2 68279:NRP2 13581	*6A6A-AA-TT*	11	72	15.28	3	101	2.97	5.89	1.58–21.96	0.0045	0.1069
VEGF+936:MMP3-1171:NRP2 13581	*CC-6A6A-TT*	11	72	15.28	3	101	2.97	5.89	1.58–21.96	0.0045	0.0935
MMP9-1562:NRP2 13581	*CC-TT*	25	72	34.72	14	102	13.73	3.34	1.59–7.04	0.0016	0.0124
NRP2 13581	*TT*	34	72	47.22	26	102	25.49	2.62	1.38–4.97	0.0036	0.0109
NRP2 13581	*GT*	28	72	38.89	62	102	60.78	0.41	0.22–0.76	0.0055	0.0167
TIMP1-536:NRP2 13581:KDR 14011	*CC-GT-TC*	0	15	0.00	13	32	40.63	0.09	0.01–0.75	0.0039	0.0386
VEGF+936:TIMP1-536:NRP2 13581:KDR 14011	*CC-CC-GT-TC*	0	15	0.00	13	32	40.63	0.09	0.01–0.75	0.0039	0.0463
VEGF-2578:VEGF+936:NRP2 68279:KDR 17693	*CC-CC-AA-CC*	1	72	1.39	14	102	13.73	0.09	0.01–0.69	0.0046	0.2022

Примечание. OR – отношение шансов; OR's 95 % CI – 95 % доверительный интервал для OR; $P(tmF_2)$ – уровень статистической значимости (*p*) различий по точному методу Фишера (двусторонняя); P_cor – скорректированное значение $P(tmF_2)$ (с учетом поправки Бонферрони).
* Данные в таблице отсортированы по убыванию величины OR.

VEGF+936 CC: *MMP3-1171 5A5A*: *MMP9-1562 CC* в геноме одного индивида, среди пациентов со вторичной лимфедемой превышает частоту аналогичного показателя в группе контроля более чем в 3 раза (OR = 3.37, $p = 0.0110$). Еще более «широкий» комбинированный генетический признак, включающий в себя сочетание гомозиготных вариантов генов *VEGF-2578 CC*: *VEGF+936 CC*: *MMP2-1306 TT*: *MMP9-1562 CC*, чаще выявляется среди пациентов со вторичной лимфедемой и характеризуется величиной показателя OR = 11.71 ($p = 0.0178$). Наряду с этим частота другого генетического признака, представленного сочетанием вариантов *VEGF+936 CC*: *MMP2-1306 TC*: *MMP3-1171 6A6A* в группе пациентов снижена почти в 10 раз – с 9.09 % в контрольной группе до 0.99 % в группе пациентов (OR = 0.10, $p = 0.0131$). Наличие данного сочетания в геноме человека в какой-то мере может считаться протективным фактором.

С целью более детального анализа различий между структурными параметрами генов регуляции ангиогенеза нами проведено исследование характера распределения в обеих группах пациентов с первичной и вторичной лимфедемой комбинированных признаков. В настоящей работе включены результаты по полиморфизмам генов *KDR* в двух полиморфных позициях, гена *NRP* – в трех полиморфных позициях и гена *TIMPI.* Для более четкого представления данных о полученных различиях приведены результаты с уровнем достоверности двухстороннего точного метода Фишера менее 0.005 (табл. 4).

При оценке результатов обращает на себя внимание наличие в обеих группах пациентов комбинированных генетических признаков, которые альтернативно не выявляются в сопоставляемых выборках. Так, в группе с первичной лимфедемой полностью отсутствуют генетические признаки *TIMP1-536 CC*: *NRP2 13581 GT*: *KDR 14011*

TC и *VEGF+936 CC*: *TIMP1-536 CC*: *NRP2 13581 GT*: *KDR 14011 TC*. В обоих случаях эти комбинации достаточно широко представлены (более 40 %) в группе пациентов со вторичной лимфедемой ($p = 0.0039$). В противовес этим данным, в группе пациентов со вторичной лимфедемой полностью отсутствуют генетические комбинированные признаки, представленные сочетаниями *NRP2 13581 TT*: *NRP2 92646 GG*: *KDR 14011 TC*; *MMP2-1306 CC*: *MMP3-1171 6A6A*: *NRP2 13581 TT*: *NRP2 92646 GG*; *MMP2-1306 CC*: *NRP2 13581 TT*: *NRP2 92646 GG*: *KDR 14011 TC*; *MMP3-1171 6A6A*: *MMP9-1562 CC*: *NRP2 13581 TT*: *NRP2 92646 GG* и ряда других. Уровень значимости достоверности различий по этим выборкам колеблется в интервале от 0.0003 до 0.005.

Учитывая ранее полученные многочисленные данные о влиянии полиморфизма генов регуляторных факторов на экспрессию и продукцию, мы провели исследование концентраций белков MMP 1, 2, 3, 9; их тканевых ингибиторов TIMP 1, 2, 3, а также VEGF, который не показал достоверных различий между группами пациентов с первичной и вторичной лимфедемой по медианному двустороннему U-критерию Манна–Уитни. При этом проведение сплошного корреляционного анализа выявило не только взаимозависимость концентрации изучаемых белковых продуктов MMP, TIMP и VEGF, но и выраженные различия в структуре корреляционных матриц пациентов с обеими формами лимфедемы.

При первичной лимфедеме наиболее значимые корреляционные отношения отмечаются между содержанием в сыворотке крови MMP2 и тканевого ингибитора TIMP2 ($OR = 0.703$, $p < 0.01$), тогда как концентрация VEGF в сыворотке крови обратно коррелирует с концентрацией MMP3 в том же субстрате ($OR = –0.629$, $p < 0.05$). При вторичной лимфедеме наиболее значимые взаимозависимости выявляются между концентрациями MMP2 и TIMP2 в тканевой жидкости ($OR = 0.727$, $p < 0.01$). Концентрация VEGF в сыворотке крови обратно коррелирует с содержанием этого ростового фактора и MMP9 в тканевой жидкости (данные в таблицах не представлены). Отмечаются и иные прямые и обратные корреляционные связи между признаками, что, вероятно, указывает на функционирование единой системы гуморальных факторов, участвующих в процессах ангиогенеза и лимфангиогенеза.

С учетом представленных данных о выраженной ассоциативной связи между анализируемыми комплексными генетическими признаками и различными формами течения лимфедемы мы провели дополнительный анализ зависимости высоких или низких уровней концентрации белков MMP 1, 2, 3, 9; их тканевых ингибиторов TIMP 1, 2, 3 и VEGF от наличия различных комбинированных генотипов у пациентов обеих групп (табл. 5).

Проведенный квантильный анализ показал, что при первичной лимфедеме выявляются генотипы, ассоциированные исключительно с низкими значениями MMP2 и TIMP2 как в сыворотке крови, так и в тканевой жидкости пациентов. В группе пациентов со вторичной лимфедемой показаны иные разнонаправленные ассоциативные связи уровней исследуемых белков с комбинированными генетическими признаками, которые в группе пациентов с первичной лимфедемой отсутствуют.

Обсуждение

Первичная лимфедема возникает в результате изолированной или развивающейся в составе синдрома врожденной аномалии лимфатической системы и связана с дисплазией, гипоплазией или гиперплазией компонентов лимфатической системы. Нижние конечности поражаются при первичной лимфедеме в большинстве случаев (Gordon et al., 2021). Вторичная же лимфедема развивается как осложнение другого заболевания или вмешательства в результате нарушения анатомической целостности или облитерации лимфатических коллекторов, удаления или поражения лимфатических узлов с последующим нарушением оттока лимфы, стазом лимфы в лимфатических сосудах и повышением эндолимфатического давления (Executive Committee…, 2020). Поэтому важно понимание генетических особенностей этих нарушений.

При первичной лимфедеме нами установлено повышение частоты *MMP2-1306C* аллельного варианта гена, гомозиготного варианта *CC* в единичном генотипе и в составе еще 10 из 17 комбинированных генетических признаков, частота которых выше при этой форме заболевания с очевидной генетической предрасположенностью (Повещенко и др., 2010; Шевченко и др., 2020).

MMP2 – одна из семейства цинк-зависимых эндопептидаз, которые впервые были обнаружены как протеазы, нацеленные на внеклеточные белки и расщепляющие их. Однако последние 20 лет обсуждается и внутриклеточное значение MMP, расширяется исследование нового аспекта их функций (Bassiouni et al., 2021). Полиморфизм гена *MMP2-1306* играет заметную роль в канцерогене, в частности вариант *C* ассоциирован с протективной ролью в развитии рака простаты (Zhang et al., 2017), его частота выше среди пациентов с бронхиальной астмой (Chen et al., 2020). Есть целый ряд сообщений об изменении частоты встречаемости вариантов этого полиморфного гена в промоторном регионе и с другими заболеваниями, однако данные об его ассоциации с развитием первичной лимфедемы представляются нами впервые.

Приводятся впервые данные об изменениях частоты выявления при лимфедеме вариантов *5A* и *6A* в полиморфной точке гена *MMP3-1171*. Так, среди пациентов со вторичной лимфедемой характерно присутствие вариантов *5A5A* в составе комбинированных признаков, частота которых выше при этой форме заболевания наряду с присутствием вариантов *6A6A* в составе признаков, частота которых ниже при вторичной лимфедеме. При первичной лимфедеме такой закономерности нет. Дискриминирующая роль наличия гомозиготного варианта *6A6A* гена *MMP3-1171* ярко проявляется при анализе данных сравнения характера распределения комбинированных генетических признаков между группами пациентов с первичной и вторичной формами лимфедемы. Мы полагаем, что обнаруженный феномен требует дальнейшего изучения и более подробного клинического анализа.

Согласно полученным нами данным, представленным в табл. 3, вариант *6A6A* гена *MMP3* в позиции *–1171* как единый признак, так и в составе ряда комбинированных генетических признаков, ассоциирован с низкими значениями содержания MMP2 и TIMP2 в сыворотке крови пациентов с первичной лимфедемой. Гомозиготный вариант

Таблица 5. Связь полиморфизма исследуемых генов с различным уровнем содержания лабораторных показателей в сыворотке и тканях пациентов с первичной и вторичной лимфедемой

Полиморфизмы	Генотипы	Лабораторные показатели	Уровень лабораторного показателя						OR	OR's 95 % CI	P(tmF$_2$)
			Высокий			Низкий					
			n	*N*	%	*n*	*N*	%			
Первичная лимфедема (*N* = 44 чел.)											
MMP3-1171	*6A6A*	MMP2-сыв	2	7	28.57	7	8	87.50	0.06	0.00–0.82	0.0406
MMP3-1171	*6A6A*	TIMP2-сыв	0	7	0.00	7	8	87.50	0.03	0.00–0.42	0.0014
MMP2-1306:KDR 14011	*CC-TC*	MMP2-сыв	0	7	0.00	5	8	62.50	0.08	0.01–0.95	0.0256
MMP3-1171:KDR 14011	*6A6A-TC*	MMP2-сыв	0	7	0.00	6	8	75.00	0.05	0.00–0.64	0.0070
MMP2-1306:MMP3-1171	*CC-6A6A*	TIMP2-сыв	0	7	0.00	5	8	62.50	0.08	0.01–0.95	0.0256
MMP3-1171:KDR 17693	*6A6A-CC*	TIMP2-сыв	0	7	0.00	5	8	62.50	0.08	0.01–0.95	0.0256
MMP3-1171:KDR 14011	*6A6A-TC*	TIMP2-сыв	0	7	0.00	5	8	62.50	0.08	0.01–0.95	0.0256
Вторичная лимфедема (*N* = 66 чел.)											
KDR 17693	*CT*	VEGF-сыв	4	5	80.00	0	6	0.00	17.50	1.22–250.37	0.0152
NRP2 68279	*AA*	TIMP3-тка	11	11	100.0	3	10	30.00	24.00	2.25–255.95	0.0010
VEGF 2578:MMP9-1562	*CA-CC*	MMP1-сыв	5	7	71.43	1	9	11.11	20.00	1.42–282.46	0.0350
MMP2-1306:MMP9-1562	*TC-CC*	MMP1-сыв	4	7	57.14	0	9	0.00	12.50	1.09–143.44	0.0192
MMP9-1562:KDR 17693	*CC-CC*	MMP2-сыв	6	11	54.55	0	10	0.00	12.83	1.26–130.52	0.0124
MMP9-1562:KDR 17693	*CC-CC*	MMP3-сыв	8	14	57.14	1	11	9.09	13.33	1.32–134.62	0.0330
NRP2 92646:KDR 17693	*GG-CT*	VEGF-сыв	4	5	80.00	0	6	0.00	17.50	1.22–250.37	0.0152
VEGF+936:NRP2 13581	*CC-GT*	VEGF-тка	5	6	83.33	3	11	27.27	13.33	1.07–166.38	0.0498
MMP2-1306:MMP9-1562	*TC-CC*	VEGF-тка	3	6	50.00	0	11	0.00	12.00	1.02–141.34	0.0294
MMP9-1562:NRP2 13581	*CC-GT*	VEGF-тка	5	6	83.33	1	11	9.09	50.00	2.56–977.02	0.0054
MMP9-1562:KDR 14011	*CC-TC*	VEGF-тка	4	6	66.67	1	11	9.09	20.00	1.39–287.61	0.0276
NRP2 13581:NRP2 92646	*GT-GA*	VEGF-тка	3	6	50.00	0	11	0.00	12.00	1.02–141.34	0.0294
MMP9-1562:NRP2 92646	*CC-GG*	TIMP3-сыв	7	13	53.85	0	9	0.00	11.43	1.15–113.12	0.0167
VEGF+936:NRP2 68279	*CC-AA*	TIMP3-тка	10	11	90.91	3	10	30.00	23.33	1.99–273.31	0.0075
MMP2-1306:NRP2 68279	*CC-AA*	TIMP3-тка	8	11	72.73	0	10	0.00	24.75	2.33–262.60	0.0010
MMP9-1562:NRP2 68279	*CC-AA*	TIMP3-тка	7	11	63.64	1	10	10.00	15.75	1.42–174.25	0.0237
NRP2 68279:NRP2 92646	*AA-GG*	TIMP3-тка	8	11	72.73	1	10	10.00	24.00	2.06–279.64	0.0075
MMP2-1306	*CC*	MMP3-сыв	6	14	42.86	10	11	90.91	0.08	0.01–0.76	0.0330
NRP2 68279	*AC*	TIMP3-тка	0	11	0.00	6	10	60.00	0.06	0.01–0.62	0.0039
MMP2-1306:NRP2 92646	*CC-GG*	MMP3-сыв	3	14	21.43	9	11	81.82	0.06	0.01–0.45	0.0048

Примечание. OR – отношение шансов; OR's 95 % CI – 95 % доверительный интервал для OR; P(tmF$_2$) – уровень статистической значимости (*p*) различий по точному методу Фишера (двусторонняя); сыв – в сыворотке крови; тка – в тканевой жидкости.

MMP2-1306 CC в составе комбинированных генетических признаков также ассоциирован с низкими значениями уровня MMP2 и TIMP2 в сыворотке крови при первичной лимфедеме.

У пациентов с развитием вторичной лимфедемы *MMP2 C* ассоциирован уже с высоким содержанием MMP1 и MMP3 в сыворотке крови, с высоким содержанием VEGF и TIMP3 в тканевой жидкости. Зависимости уровня ни одного из анализируемых количественных признаков от вариантов гена *MMP3-1171* при вторичной лимфедеме, в отличие от ее первичной формы, не установлено.

Можно заключить, что в развитии первичной лимфедемы значительную роль играют генетические факторы, связанные с семейством генов *VEGF* и их рецепторов *VEGFR*, участвующих в регуляции и развитии сосудистых сетей лимфатической и кровеносной систем.

Рецептор третьего типа VEGFR3 выполняет основную функцию в развитии и становлении лимфатической системы. Аутосомно-доминантные мутации *VEGFR3*, препятствующие функционированию рецептора как гомодимера, не только вызывают одну из основных форм наследственного первичного лимфостаза, собственно первичную лимфедему (болезнь Милроя), но и участвуют в предрас-

положенности к развитию распространенных цианотических врожденных пороков сердца, демонстрируя новую функцию VEGFR3 в раннем развитии тканей сердца (Monaghan et al., 2021). Отсюда становится понятным интерес к исследованию роли целого ряда генов семейства VEGFR (особенно *NRP-2*), связанных с развитием ангиогенеза и васкулогенеза, генов ростового фактора эндотелия *VEGF*, металлопротеиназ межклеточной основы сосудистого русла *MMP* и их тканевых ингибиторов *TIMP*.

В результате исследований появляется все больше данных о том, что в развитии вторичной лимфедемы, развивающейся вследствие оперативных нарушений сосудистого русла типа мастэктомии, определенную роль играют и генетические факторы предрасположенности к развитию лимфатических отеков конечностей, что позволяет надеяться на создание прогностических критериев выявления групп повышенного риска их развития и проведения профилактических мероприятий. Практическая значимость и перспективность таких исследований заключаются в позитивных результатах разрабатываемой терапии лимфедемы, в том числе и с помощью индукторов лимфангиогенеза препаратами VEGF (Forte et al., 2019).

Заключение

Среди пациентов как с первичной, так и вторичной лимфедемой отмечаются достоверные отклонения от нормативных показателей, установленных для контрольной группы здоровых лиц, в частоте распределения целого ряда комплексных генотипов генов *MMP 2*, *3*, *9* и *VEGF*, что указывает на существенное влияние исследованного фрагмента генотипа пациента на предрасположенность к этим типам лимфатического отечного синдрома.

Группы пациентов с первичной и вторичной лимфедемой существенно различаются между собой по характеру распределения ряда комплексных генотипов генов *MMP 2*, *3*, *9* и *VEGF*, что свидетельствует о многочисленных путях реализации генетической предрасположенности к развитию этих патологических состояний.

Сравнительный анализ не выявил достоверных различий в концентрациях матричных металлопротеиназ, их тканевых ингибиторов и факторов роста сосудистого эндотелия в сыворотке крови и тканевой жидкости пациентов с первичной и вторичной лимфедемой.

Как при первичной, так и при вторичной лимфедеме установлены различные ассоциативные связи между исследуемыми комбинированными генотипами полиморфизма генов факторов регуляции ангиогенеза и уровнем концентрации белковых продуктов этих генов в сыворотке крови и тканевой жидкости, что, в свою очередь, указывает на наличие определенных геномно-метаболомных механизмов реализации генетической предрасположенности к развитию лимфатических отеков.

Получены данные о повышении частоты встречаемости гомозиготного варианта *CC* в полиморфной точке *-1306* гена *MMP2* и при первичной лимфедеме и повышении частоты гомозиготного варианта гена *MMP3-1171 5A5A* при вторичной лимфедеме. Оба эти полиморфизма ассоциированы с количественными показателями содержания белковых продуктов MMP, TIMP и VEGF при различных вариантах развития лимфедемы конечностей.

Список литературы / References

Повещенко А.Ф., Нимаев В.В., Любарский М.С., Коненков В.И. Медицинские и генетические аспекты лимфедемы. *Мед. генетика.* 2010;9(9):3-9
[Poveshchenko A.F., Nimaev V.V., Lyubarsky M.S., Konenkov V.I. Medical and genetical aspects of lymphedema. *Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics.* 2010;9(99):3-9 (in Russian)]

Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Хапаев Р.С., Нимаев В.В. Полиморфизм генов фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*) и матриксных металлопротеиназ (*MMP*) при первичной лимфедеме конечностей. *Мед. иммунология.* 2020;22(3):497-506. DOI 10.15789/1563-0625-POV-1913
[Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Konenkov V.I., Khapaev R.S., Nimaev V.V. Polymorphism of vascular endothelial growth factor gene (*VEGF*) and matrix metalloproteinase (*MMP*) genes in primary limb lymphedema. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology*. 2020;22(3):497-506. DOI 10.15789/1563-0625-POV-1913 (in Russian)]

Bassiouni W., Ali M., Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J.* 2021;288(24):7162-7182. DOI 10.1111/febs.15701

Cabral-Pacheco G.A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C., Ramirez-Acuña J.M., Perez-Romero B.A., Guerrero-Rodriguez J.F., Martinez-Avila N., Martinez-Fierro M.L. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(24):9739. DOI 10.3390/ijms21249739

Chen L.-H., Chiu K.-L., Hsia T.-C., Lee Y.-H., Shen T.-C., Li C.-H., Shen Y.-C., Chang W.-S., Tsai C.-W., Bau D.-T. Significant association of MMP2 promoter genotypes to asthma susceptibility in Taiwan. *In Vivo.* 2020;34(6):3181-3186. DOI 10.21873/invivo.12153

Detry B., Erpicum C., Paupert J., Blacher S., Maillard C., Bruyère F., Pendeville H., Remacle T., Lambert V., Balsat C., Ormenese S., Lamaye F., Janssens E., Moons L., Cataldo D., Kridelka F., Carmeliet P., Thiry M., Foidart J.M., Struman I., Noël A. Matrix metalloproteinase-2 governs lymphatic vessel formation as an interstitial collagenase. *Blood.* 2012;119(21):5048-5056. DOI 10.1182/blood-2011-12-400267

Executive Committee of the International Society of Lymphology. The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema: 2020 Consensus Document of the International Society of Lymphology. *Lymphology*. 2020;53(1):3-19

Forte A.J., Boczar D., Huayllani M.T., Lu X., McLaughlin S.A. Pharmacotherapy agents in lymphedema treatment: A systematic review. *Cureus*. 2019;11(12):e6300. DOI 10.7759/cureus.6300

Gao X., Ma F., Hao H., Dai Y., Liu W., Xiao X., Gao P., Li S. Association of *VEGFA* polymorphisms with necrotizing enterocolitis in Chinese Han population. *Pediatr. Neonatol.* 2019;60(2):129-134. DOI 10.1016/j.pedneo.2018.07.002

Gao Y., Lee Y., Almazyad A., Birsner A., Li D., Wong S., Wen A., D'Amato R., Adam R.M., Dixon J.B., Srinivasan R.S., Chen H., Bielenberg D.R. Loss of neuropilin 2 in adult lymphatic endothelium promotes lymphedema. *FASEB J.* 2020;34(S1):1. DOI 10.1096/fasebj.2020.34.s1.06345

Gordon K., Mortimer P.S., van Zanten M., Jeffery S., Ostergaard P., Mansour S. The St George's classification algorithm of primary lymphatic anomalies. *Lymphat. Res. Biol.* 2021;19(1):25-30. DOI 10.1089/lrb.2020.0104

Luo Y., Luo J., Peng H. Associations between genetic polymorphisms in the *VEGFA*, *ACE*, and *SOD2* genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2019;23(9):644-651. DOI 10.1089/gtmb.2018.0320

Miller A. Lymphedema-clinical picture and therapy. Review. *Hautarzt.* 2020;71(1):32-38. DOI 10.1007/s00105-019-04523-z

Monaghan R.M., Page D.J., Ostergaard P., Keavney B.D. The physiological and pathological functions of VEGFR3 in cardiac and lymphatic development and related diseases. *Cardiovasc. Res.* 2021;117(8):1877-1890. DOI 10.1093/cvr/cvaa291

Mucka P., Levonyak N., Geretti E., Zwaans B., Li X., Adini I., Klagsbrun M., Adam R., Bielenberg D. Inflammation and lymphedema are exacerbated and prolonged by neuropilin 2 deficiency. *Am. J. Pathol*. 2016;186(11):2803-2812. DOI 10.1016/j.ajpath.2016.07.022

Quirion E. Recognizing and treating upper extremity lymphedema in postmastectomy/lumpectomy patients: a guide for primary care providers. *J. Am. Acad. Nurse. Pract.* 2010;22(9):450-459. DOI 10.1111/j.1745-7599.2010.00542.x

Rauniyar K., Jha S.K., Jeltsch M. Biology of vascular endothelial growth factor C in the morphogenesis of lymphatic vessels. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2018;6:7. DOI 10.3389/fbioe.2018.00007

Saik O.V., Nimaev V.V., Usmonov D.B., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Prioritization of genes involved in endothelial cell apoptosis by their implication in lymphedema using an analysis of associative gene networks with ANDSystem. *BMC Med. Genomics.* 2019;12(Suppl. 2):47. DOI 10.1186/s12920-019-0492-9

Stevens M., Oltean S. Modulation of receptor tyrosine kinase activity through alternative splicing of ligands and receptors in the VEGF-A/VEGFR axis. *Cells* 2019;8(4):288. DOI 10.3390/cells8040288

Vaahtomeri K., Karaman S., Mäkinen T., Alitalo K. Lymphangiogenesis guidance by paracrine and pericellular factors. *Genes Dev.* 2017;31(16):1615-1634. DOI 10.1101/gad.303776.117

Vignes S. Lymphedema: from diagnosis to treatment. *Rev. Med. Interne.* 2017;38(2):97-105. DOI 10.1016/j.revmed.2016.07.005

Watson C.J., Webb N.J.A., Bottomley M.J., Brenchley P.E.C. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: Correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine.* 2000;12(8):1232-1235. DOI 10.1006/cyto.2000.0692

Yap R.W.K., Lin M.H., Shidoji Y., Yap W.S. Association of stress, mental health, and *VEGFR-2* gene polymorphisms with cardiometabolic risk in Chinese Malaysian adults. *Nutrients.* 2019;11(5):1140. DOI 10.3390/nu11051140

Zhang K., Chen X., Zhou J., Yang C., Zhang M., Chao M., Zhang L., Liang C. Association between MMP2-1306 C/T polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis based on 3906 subjects. *Oncotarget*. 2017;8(27):45020-45029. DOI 10.18632/oncotarget.16972

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.12.2023. После доработки 26.02.2024. Принята к публикации 26.02.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):443-455

DOI 10.18699/vjgb-24-50

Конвейер обработки гиперспектральных изображений на примере исследования зерен ячменя, содержащих меланин

И.Д. Бусов[1, 2], М.А. Генаев[1, 2], Е.Г. Комышев[1], В.С. Коваль[1], Т.Е. Зыкова[1, 2], А.Ю. Глаголева[1], Д.А. Афонников[1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

i.busov@g.nsu.ru

Аннотация. Анализ гиперспектральных изображений представляет большой интерес при изучении растений. В настоящее время такой анализ используется все более широко, поэтому создание методов обработки гиперспектральных изображений является актуальной задачей. В статье представлен конвейер для работы с гиперспектральными изображениями, который включает: предварительную обработку, базовый статистический анализ, визуализацию многоканального гиперспектрального изображения, а также решение задач классификации и кластеризации с применением методов машинного обучения. В текущей версии пакета программ реализованы следующие методы: построение доверительного интервала произвольного уровня для разницы выборочных средних; проверка сходства распределений интенсивности линий спектра для двух наборов гиперспектральных изображений на основе U-критерия Манна–Уитни и критерия согласия Пирсона; визуализация в двухмерном пространстве с применением методов понижения размерности PCA, ISOMAP и UMAP; классификация с использованием линейной или гребневой регрессии, случайного леса и градиентного бустинга; кластеризация образцов с помощью EM-алгоритма. Программный конвейер реализован на языке Python с использованием библиотек Pandas, NumPy, OpenCV, SciPy, Sklearn, Umap, CatBoost и Plotly. Исходный код доступен по адресу: https://github.com/igor2704/Hyperspectral_images. Данный конвейер был применен для идентификации пигмента меланина в оболочке зерен ячменя на базе гиперспектральных данных. Визуализация на основе методов PCA, UMAP и ISOMAP, а также использование алгоритмов кластеризации показали, что на базе гиперспектральных данных с высокой точностью можно провести линейное разделение образцов зерен с пигментацией и без нее. Анализ выявил статистически значимые различия в распределении медиан интенсивности для выборок изображений зерен с пигментом и без него. Таким образом, продемонстрировано, что с помощью гиперспектральных изображений с большой точностью можно определить наличие или отсутствие меланина в зернах ячменя. Созданный в данной работе гибкий и удобный инструмент позволит существенно повысить эффективность анализа гиперспектральных изображений.

Ключевые слова: гиперспектральные изображения; машинное обучение; статистический анализ; зерна ячменя; пигментный состав.

Для цитирования: Бусов И.Д., Генаев М.А., Комышев Е.Г., Коваль В.С., Зыкова Т.Е., Глаголева А.Ю., Афонников Д.А. Конвейер обработки гиперспектральных изображений на примере исследования зерен ячменя, содержащих меланин. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):443-455. DOI 10.18699/vjgb-24-50

Финансирование. Разработка структуры конвейера, алгоритмов и программ выполнена при поддержке РНФ, проект № 22-74-00122.

Благодарности. Тестирование конвейера и обработка данных проведены с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Биоинформатика» (при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020).

A pipeline for processing hyperspectral images, with a case of melanin-containing barley grains as an example

I.D. Busov[1, 2], M.A. Genaev[1, 2], E.G. Komyshev[1], V.S. Koval[1], T.E. Zykova[1, 2], A.Y. Glagoleva[1], D.A. Afonnikov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

i.busov@g.nsu.ru

Abstract. Analysis of hyperspectral images is of great interest in plant studies. Nowadays, this analysis is used more and more widely, so the development of hyperspectral image processing methods is an urgent task. This paper presents a hyperspectral image processing pipeline that includes: preprocessing, basic statistical analysis, visualization of a multichannel hyperspectral image, and solving classification and clustering problems using machine learning methods. The current version of the package implements the following methods: construction of a confidence interval of an arbitrary level for the difference of sample averages; verification of the similarity of intensity distributions of spectral lines for two sets of hyperspectral images on the basis of the Mann–Whitney U-criterion and Pearson's

© Бусов И.Д., Генаев М.А., Комышев Е.Г., Коваль В.С., Зыкова Т.Е., Глаголева А.Ю., Афонников Д.А., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

criterion of agreement; visualization in two-dimensional space using dimensionality reduction methods PCA, ISOMAP and UMAP; classification using linear or ridge regression, random forest and catboost; clustering of samples using the EM-algorithm. The software pipeline is implemented in Python using the Pandas, NumPy, OpenCV, SciPy, Sklearn, Umap, CatBoost and Plotly libraries. The source code is available at: https://github.com/igor2704/Hyperspectral_images. The pipeline was applied to identify melanin pigment in the shell of barley grains based on hyperspectral data. Visualization based on PCA, UMAP and ISOMAP methods, as well as the use of clustering algorithms, showed that a linear separation of grain samples with and without pigmentation could be performed with high accuracy based on hyperspectral data. The analysis revealed statistically significant differences in the distribution of median intensities for samples of images of grains with and without pigmentation. Thus, it was demonstrated that hyperspectral images can be used to determine the presence or absence of melanin in barley grains with great accuracy. The flexible and convenient tool created in this work will significantly increase the efficiency of hyperspectral image analysis.
Key words: hyperspectral images; machine learning; statistical analysis; barley grains; pigment composition.

For citation: Busov I.D., Genaev M.A., Komyshev E.G., Koval V.S., Zykova T.E., Glagoleva A.Y., Afonnikov D.A. A pipeline for processing hyperspectral images, with a case of melanin-containing barley grains as an example. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):443-455. DOI 10.18699/vjgb-24-50

Введение

Наличие пигментов в оболочке зерна влияет на его различные технологические свойства. Например, флавоноиды, антоцианы и каротиноиды обладают рядом ценных свойств, являются антиоксидантами и влияют на пищевую ценность зерна. Добавление в муку отрубей пшеницы с пурпурным перикарпием или голубым алейроновым слоем позволяет улучшить качество хлебопекарной продукции за счет вкусовых, текстурных и цветовых характеристик (Machálková et al., 2017). Флобафены, придающие окраске перикарпия зерна красный цвет, положительно воздействуют на продолжительность состояния покоя зерна и препятствуют его предуборочному прорастанию (Flintham et al., 2002). Ввиду этого генотипы пшеницы с красной окраской зерен используются в селекции в качестве доноров генов устойчивости к предуборочному прорастанию зерна (Крупнов, 2013; Fakthongphan et al., 2016).

Генетический контроль формирования окраски как зерен, так и других органов растений осуществляется генами, кодирующими ферменты, вовлеченными в биосинтез пигментов, а также регуляторными генами (Khlestkina, 2014; Lachman et al., 2017; Шоева и др., 2018). Для ряда пигментов эти гены исследованы достаточно хорошо, вплоть до полной расшифровки их нуклеотидных последовательностей и расположения в геноме. Однако для некоторых пигментов, например меланина, определяющего черную окраску зерен ячменя, молекулярные механизмы биосинтеза еще полностью не известны (Glagoleva et al., 2017; Шоева и др., 2018).

Высокопроизводительные, неразрушающие и точные методы измерения играют важную роль при оценке качества семян и улучшении сельскохозяйственного производства (Афонников и др., 2016; Afonnikov et al., 2021). Технологии гипер- и мультиспектральной визуализации, охватывающие видимый, ближний инфракрасный диапазоны длин волн, предоставляют спектральную и пространственную информацию для каждого пикселя изображения. Гиперспектральные изображения – это значения интенсивностей отраженного излучения для сотен интервалов длин волн, что существенно больше, чем для мультиспектральных изображений с несколькими диапазонами волн (Gowen et al., 2007).

За счет уменьшения общего объема данных мультиспектральные системы визуализации нацелены на быстрое получение изображений с относительно низким пространственным разрешением и могут использоваться в режиме реального времени. Гиперспектральные же изображения обычно применяются в качестве наборов данных, из которых можно определить оптимальные диапазоны волн, которые будут в дальнейшем использоваться при мультиспектральной визуализации в решении конкретной прикладной задачи (Qin et al., 2013). Такие технологии позволяют получать более точную информацию о характеристиках отраженного излучения объектов по сравнению с цифровыми изображениями RGB (трехканальные изображения. Red, green, blue – красный, зеленый, синий).

Анализ гиперспектральных данных успешно применялся для оценки и предсказания урожайности сельскохозяйственных культур. L. Serrano с коллегами прогнозировали биомассу и урожайность озимой пшеницы с помощью спектральных индексов (Serrano et al., 2000). W.S. Weber с коллегами (2012) предсказывали урожайность зерна, используя спектры (495–1853 нм) отражения кроны и листьев растений кукурузы, выращенных при различных водных режимах, и получили наиболее подходящие длины волн для прогнозирования урожайности. X. Zhang и Y. He (2013) разработали метод ранней и быстрой оценки урожайности семян с помощью гиперспектральных изображений листьев масличного рапса в видимой и ближней инфракрасной областях (380–1030 нм). Урожайность семян сои (*Glycine max*) прогнозировалась на основе гиперспектральных данных (395–1005 нм) и алгоритмов машинного обучения: многослойного персептрона, метода опорных векторов и случайного леса, что позволило также выявить наиболее значимый спектр отражения (395 нм) (Yoosefzadeh-Najafabadi et al., 2021).

Анализ гиперспектральной отражательной способности может предоставить достоверную информацию о жизнеспособности семян как сорных (Matzrafi et al., 2017), так и культурных растений: риса (He et al., 2019; Jin et al., 2022), пшеницы (Zhang et al., 2018), кукурузы (Ambrose et al., 2016; Wakholi et al., 2018), арахиса (Zou et al., 2023), дыни (Kandpal et al., 2016), японской шпинатной горчицы (Ma et al., 2020).

На основе гиперспектральных технологий разрабатываются инновационные методы диагностики болезней растений (Чешкова, 2022). Технология гиперспектральных изображений, охватывающих видимый и ближний инфра-

красный диапазон длин волн (400–1000 нм), применялась для анализа риса с целью обнаружения обесцвеченных, больных семян, зараженных бактериальным ожогом метелок (*Burkholderia glumae*). Было показано, что для точной (более 90 %) классификации пораженных патогеном и здоровых растений достаточно определить интенсивность отраженного излучения в небольшом количестве диапазонов длин волн (Baek et al., 2019).

Гиперспектральные изображения используются для определения химического состава семян культурных растений. Показано, что анализ отраженного излучения в ближнем инфракрасном диапазоне (895–2504 нм) имеет потенциал в прогнозировании содержания антоцианов в зернах черного риса (Amanah et al., 2021). C. Liu с коллегами (2020) продемонстрировали возможность использования технологии анализа гиперспектральных данных в ближнем инфракрасном диапазоне (930–2500 нм) для определения содержания крахмала в зернах кукурузы. В работе G. Yang с коллегами (2018) была применена рамановская гиперспектральная технология с линейным сканированием для определения химического состава семян кукурузы. Было обнаружено, что характеристические пики комбинационного рассеяния, идентифицированные при 477, 1443, 1522, 1596 и 1654 нм в спектре от 380 до 1800 нм, были связаны с кукурузным крахмалом, смесью масла и крахмала, зеаксантином, лигнином и маслом в семенах кукурузы соответственно.

Метод неразрушающей оценки концентраций и пространственного распределения влаги, белка и сахаров на разных стадиях развития семян вигны был предложен на основе мультиспектральных данных 20 дискретных длин волн в ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной областях (ElMasry et al., 2022). Методы портативной спектроскопии ближнего инфракрасного диапазона и гиперспектральных изображений применяли для количественного определения содержания масла и жирных кислот, а также классификации видов семян рода *Brassica* (da Silva Medeiros et al., 2022). Гиперспектральные изображения применяются для решения задачи классификации для зерен риса (Díaz-Martínez et al., 2023), райграса (Reddy et al., 2023) и многих других важных для аграрной промышленности культур.

Для предоставления гиперспектральной информации семян разрабатываются платформы, такие как HyperSeed, включающая высокопроизводительный спектрограф линейного сканирования (600–1700 нм), а также программное обеспечение с открытым исходным кодом на основе графического пользовательского интерфейса. Система использовалась для классификации семян риса (с точностью до 97.5 %), выращенных в условиях теплового стресса и контрольной среды, с помощью как традиционных моделей машинного обучения, так и моделей нейронных сетей (3D CNN) (Gao et al., 2021).

Таким образом, анализ гиперспектральных изображений представляет большой интерес в различных задачах, связанных с исследованием растений. Однако разработка алгоритмов анализа таких данных является трудоемкой задачей.

Мы применили данный конвейер для определения содержания меланина в зернах ячменя. Несмотря на то что присутствие меланина обуславливает темную окраску зерна, на практике визуальное определение его наличия затруднительно. Темный цвет зерна может быть связан и с увеличением количества пигментов антоцианов, которые, накапливаясь в алейроне зерновки, придают созревшим зернам серый цвет. Зерна ячменя также могут темнеть в процессе хранения. Поэтому точное определение наличия меланина требует дополнительного анализа, например погружения зерен в раствор щелочи для его экстракции.

В данной работе мы представляем инструмент для изучения гиперспектральных изображений – конвейер, использование которого может существенно сократить временные затраты в подобных исследованиях. На примере задачи определения содержания меланина в зернах ячменя продемонстрированы возможности этого конвейера. Для тестирования была выбрана задача исследования спектра зерен, содержащих и не содержащих меланин, так как известно, что в их спектре есть существенные различия. Проведенный нами анализ также показал значимые различия спектра зерен, содержащих меланин, и образцов без этого пигмента. В отличие от других работ в этой области, помимо классификации образцов, перед нами стояла задача – реализовать пакет для облегчения и автоматизации получения результатов исследования гиперспектральных изображений. Разработанный конвейер позволяет визуализировать и кластеризовать входные данные, а также проводить их статистический анализ.

Материалы и методы

Растительный материал. Для исследования были выбраны семена 313 образцов ячменя (*Hordeum vulgare*), из которых 117 содержали меланин, а у остальных 196 образцов данный пигмент отсутствовал (Приложение)[1]. Материал был получен из коллекции ячменя Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (https://www.vir.nw.ru), коллекции ячменя Института цитологии и генетики СО РАН (http://www.bionet.nsc.ru). Также был использован материал популяции Oregon Wolfe Barleys (https://barleyworld.org/owb). Биохимический анализ образцов с окрашенным зерном, а также подробное описание метода детекции меланина выполнены А.Ю. Глаголевой с коллегами (2022).

Химический метод определения пигментного состава зерен. Для определения качественного присутствия меланина в зерне была проведена экстракция 2 % NaOH с последующим почернением раствора. На основе этого метода каждому из образцов был присвоен тип пигментации по наличию пигмента: «содержат меланин» либо «не содержат меланин».

Получение изображений. Гиперспектральные изображения зерен получены с помощью камеры Cubert S185 с объективом Cinegon 1.8/16. Для этого на белый матовый лист бумаги формата А3 помещали пластиковую чашку Петри диаметром 55 мм, заполненную зернами без промежутков. По бокам располагался рассеивающий свет, камеру фиксировали на штативе сверху, объективом вертикально вниз. На выходе камера выдавала 138-канальное гиперспектральное изображение, каждый канал которого

[1] Приложение см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx16.pdf

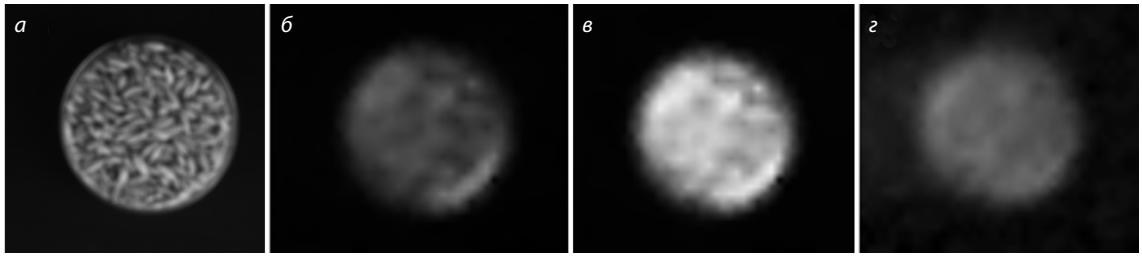


Рис. 1. Изображение зерен ячменя в чашке Петри в оттенках серого (*а*) и визуализация интенсивности отраженного излучения в интервалах длин волн 450 нм (*б*), 554 нм (*в*) и 986 нм (*г*).

Рис. 2. Схема конвейера для анализа гиперспектральных изображений.

соответствовал интенсивности отражения в определенном диапазоне длин волн (рис. 1). Размер гиперспектрального изображения: 50 × 50 пикселей, спектральный диапазон: 450–998 нм, ширина спектрального канала: 4 нм. Изображения сохраняли в формате tiff.

Таким образом, гиперспектральное изображение, полученное камерой Cubert S185, представляет собой гиперкуб, в котором индексы i, j ($i, j = 1, \ldots 50$) соответствуют пространственным координатам (пикселям изображения), индекс $k = 1, \ldots 138$ – линиям гиперспектра с определенной длиной волны. Каждый элемент этого гиперкуба соответствует интенсивности отраженного излучения от объекта съемки для пикселя на изображении с пространственными координатами i, j и спектральной линии с порядковым номером k.

Изображения для исследования пигментного состава зерен ячменя получены в результате нескольких серий съемок в течение нескольких дней.

Описание конвейера. Входными данными для конвейера являются гиперспектральные изображения в формате tiff, описанные в предыдущем разделе, и калибровочные гиперспектральные изображения (изображения черного и белого фонов в формате tiff).

Анализ многоканального гиперспектрального изображения производится в несколько этапов, включающих предобработку, извлечение признаков, нормировку и непосредственно анализ данных (рис. 2).

Предобработка гиперспектральных изображений и извлечение признаков. Характер внешнего освещения может влиять на интенсивность отраженного спектра (Zahavi et al., 2019). Для того чтобы отраженные интенсивности излучения на разных линиях спектра можно было сравнивать для разных условий съемки, мы использовали калибровку изображений по следующей формуле:

$$R_{ijk} = \frac{S_{ijk} - D_{ijk}}{W_{ijk} - D_{ijk}},$$

где S_{ijk} – элемент гиперкуба гиперспектрального изображения ячменя; D_{ijk} – элемент калибровочного изображения черного фона; W_{ijk} – элемент калибровочного изображения белого фона; R_{ijk} – элемент изображения после калибровки.

Калибровочные изображения с помощью порогового преобразования (функции threshold() библиотеки OpenCV (Howse, 2013)) преобразуются в трехканальное изображение, аппроксимирующее RGB на основе интенсивностей для длин волн 450 нм (синий цвет), 510 нм (зеленый цвет), 630 нм (красный цвет). Данное изображение преобразуется в изображение в оттенках серого (функция cvtColor() библиотеки OpenCV) и бинаризуется, чтобы выделить область чашки Петри с зернами. При необходимости конвейер позволяет использовать собственную реализацию сегментации, но для решения рассматриваемой задачи достаточно сегментации по пороговому значению.

Затем для каждого изображения по значениям пикселей в сегментированной области, занятой зернами, рассчитываются медианы для каждого гиперспектрального канала. Для сглаживания значений медиан применяется фильтр Савицкого–Голая (Savitzky, Golay, 1964). Полученный вектор медиан характеризует гиперспектральные данные для каждого исследованного образца.

Нормировка. Чтобы избавиться от различий, возникающих между сериями съемки, в конвейере были реализованы два способа нормализации изображений. Первый способ – стандартизация (вычитание выборочного среднего и деление на стандартное отклонение) по одинаковым образцам каждого изображения (вектора медиан). Второй способ – стандартизация по одинаковым группам (образцы, содержащие/не содержащие меланин), внутри каждой серии.

Анализ данных. Методы понижения размерности. Для наглядной визуализации образцов в пространстве гиперспектральных данных конвейер использует три метода снижения размерности: PCA (метод главных компонент) (Jolliffe, 2002), ISOMAP (isometric mapping) (Balasubramanian, Schwartz, 2002) и UMAP (uniform manifold approximation and projection) (McInnes et al., 2018). PCA – линейный метод снижения размерности, который сохраняет наибольший процент дисперсии.

ISOMAP, UMAP – нелинейные методы снижения размерности. Метод UMAP строит взвешенный граф, где ребрами соединены лишь ближайшие соседи (число соседей задается как параметр конвейера). Метод ISOMAP вначале строит разреженный граф, где так же, как и в графе для UMAP, ребрами соединены лишь ближайшие соседи (число соседей задается как параметр конвейера). Затем с помощью алгоритма Дейкстры (Cormen et al., 2002) либо алгоритма Флойда–Уоршалла (Cormen et al., 2002) вычисляются расстояния между объектами в разреженном графе для метода ISOMAP. После построения графов и матрицы расстояний для них с помощью методов UMAP и ISOMAP определяется положение образцов в пространстве меньшей размерности (обычно 2 или 3), которые сохраняют расстояния между объектами. Методы понижения размерности были реализованы с помощью библиотек Sklearn (Hao et al., 2019) и Umap (Becht et al., 2019).

Визуализация. После этапов предобработки и извлечения признаков каждый образец (гиперспектральное изображение) представляется в виде вектора, лежащего в пространстве размерности, равной числу каналов гиперспектрального изображения. Элементы вектора описывают интенсивность отраженного излучения для соответствующего канала. После получения координат образцов в пространствах меньшей размерности проводили визуализацию в виде диаграммы рассеяния с помощью функции plotly.express.scatter библиотеки Plotly (Stančin et al., 2019).

Кластеризация. В конвейере реализована кластеризация с помощью EM-алгоритма (Dempster et al., 1977). Предполагалось, что каждый образец может принадлежать к каждому кластеру с вероятностью, подчиняющейся модели смеси распределений Гаусса. Параметры распределений находили с помощью метода максимального правдоподобия с использованием EM-алгоритма. Основные гиперпараметры кластеризации: размерность пространства, в котором происходит кластеризация, метод понижения размерности, способ инициализации весов (случайная инициализация, инициализация методом *k*-средних). Конвейер возвращает таблицу с информацией о наиболее часто встречающейся группе в каждом кластере и проценте образцов в ней. При реализации кластеризации использовали библиотеку Sklearn.

Статистический анализ. В созданном конвейере для разницы выборочных средних двух групп изображений можно определить доверительный интервал при заданном уровне значимости, который строится на основе центральной предельной теоремы (ЦПТ). По ЦПТ, при достаточном объеме выборки можно предположить, что разница выборочных средних нормально распределена. Для этой случайной величины вычисляются выборочное среднее и выборочная дисперсия и, таким образом, строятся доверительные интервалы произвольного уровня.

Для проверки гипотезы о совпадении распределений двух групп в конвейер были добавлены тесты на основе U-критерия Манна–Уитни (Wilcoxon, 1992) и критерия хи-квадрат (Greenwood, Nikulin, 1996). Статистический анализ реализован с использованием библиотеки SciPy (Nunez-Iglesias et al., 2017).

Классификация. Разработанный конвейер позволяет классифицировать гиперспектральные изображения с помощью таких методов, как логистическая регрессия (Norman, Harry, 2007), гребневая регрессия (Norman, Harry, 2007), случайный лес (Ho, 1995) и градиентный бустинг (Prokhorenkova et al., 2018). Конвейер возвращает таблицы с результатами классификации по таким метрикам, как accuracy, F1, precision и recall, а также матрицы ошибок для каждого классификатора. Первая таблица содержит результаты классификации по макрометрикам, вторая – по микрометрикам. Если в конвейер передать функцию, которая преобразовывает группу в вектор, то конвейер вернет третью таблицу с усредненными результатами бинарной классификации для каждой отдельной компоненты вектора. Классификация реализована с использованием библиотек Sklearn и CatBoost (Hancock, Khoshgoftaar, 2020).

Результаты

Изображения образцов для анализа пигментного состава были получены из трех серий съемок. В двух сериях отсутствовали зерна, содержащие меланин. В одной серии присутствовали как зерна с меланином, так и зерна без этого пигмента. Одинаковых образцов в различных сериях съемок не было. Для каждого образца получено два изображения: гиперспектральное и изображение высокого разрешения. Так как во всех сериях съемки присутствовали образцы без пигмента, выполнялась нормализация по образцам зерен с отсутствием пигмента.

График медиан

По полученным медианам были построены графики зависимости интенсивности от длины волны для каждого изображения (рис. 3). Как можно отметить, гиперспектр зерен, содержащих меланин, заметно отличается от гиперспектра зерен без этого пигмента.

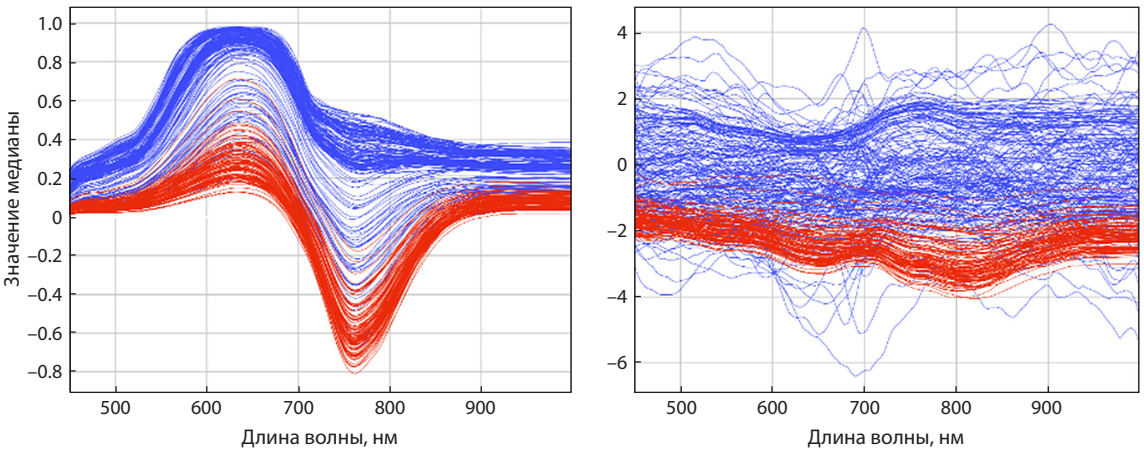


Рис. 3. График зависимости медианы интенсивности отраженного излучения для образцов зерен ячменя в зависимости от длины волны.

Слева – график без нормализации, справа – график медиан после нормировки по одинаковым группам. Синие линии соответствуют медианам изображений зерен ячменя, не содержавших меланин, красные – с меланином.

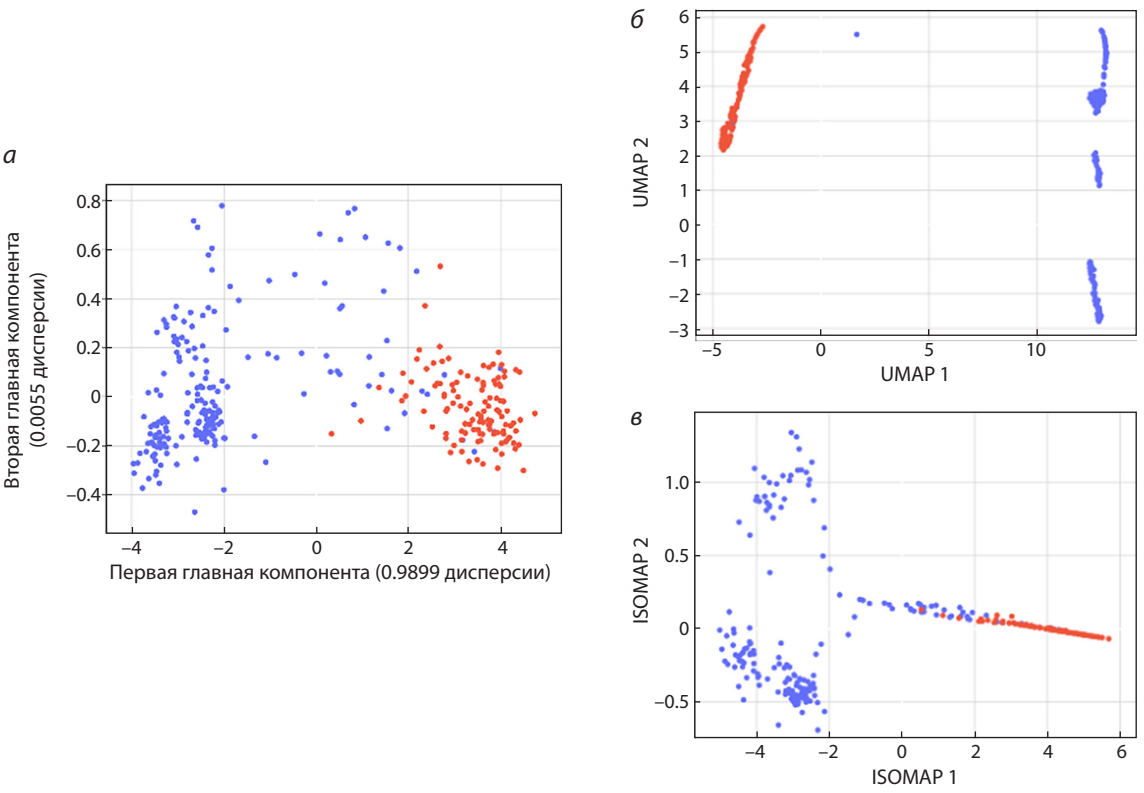


Рис. 4. Графики распределений в двухмерном пространстве, полученные с помощью PCA (*а*), UMAP (*б*) и ISOMAP (*в*).

Синие точки соответствуют образцам без меланина, красные – с меланином.

На графике без нормализации для кривых медиан наблюдаются локальные максимумы в диапазоне 600–700 нм и локальные минимумы в диапазоне 700–800 нм. Большинство кривых медиан зерен с меланином сгруппированы плотнее (средняя по длинам волн дисперсия меньше) и имеют меньшие средние значения, чем кривые образцов без пигмента на всем диапазоне длин волн. Несмотря на частичное перекрывание, большая часть кривых медиан образцов с пигментом отличима от кривых медиан образцов без пигмента.

Визуализация в двухмерном пространстве

На графиках PCA (рис. 4, *а*) и ISOMAP (см. рис. 4, *в*) можно заметить, что дисперсия у зерен без меланина больше, чем у зерен с этим пигментом.

Результаты кластеризации

Была выполнена кластеризация на два кластера, которые представляли образцы с меланином и образцы без пигмента. Кластеризация подтверждает, что медианы гиперспектральных изображений разделимы с высокой точностью (рис. 5, табл. 1).

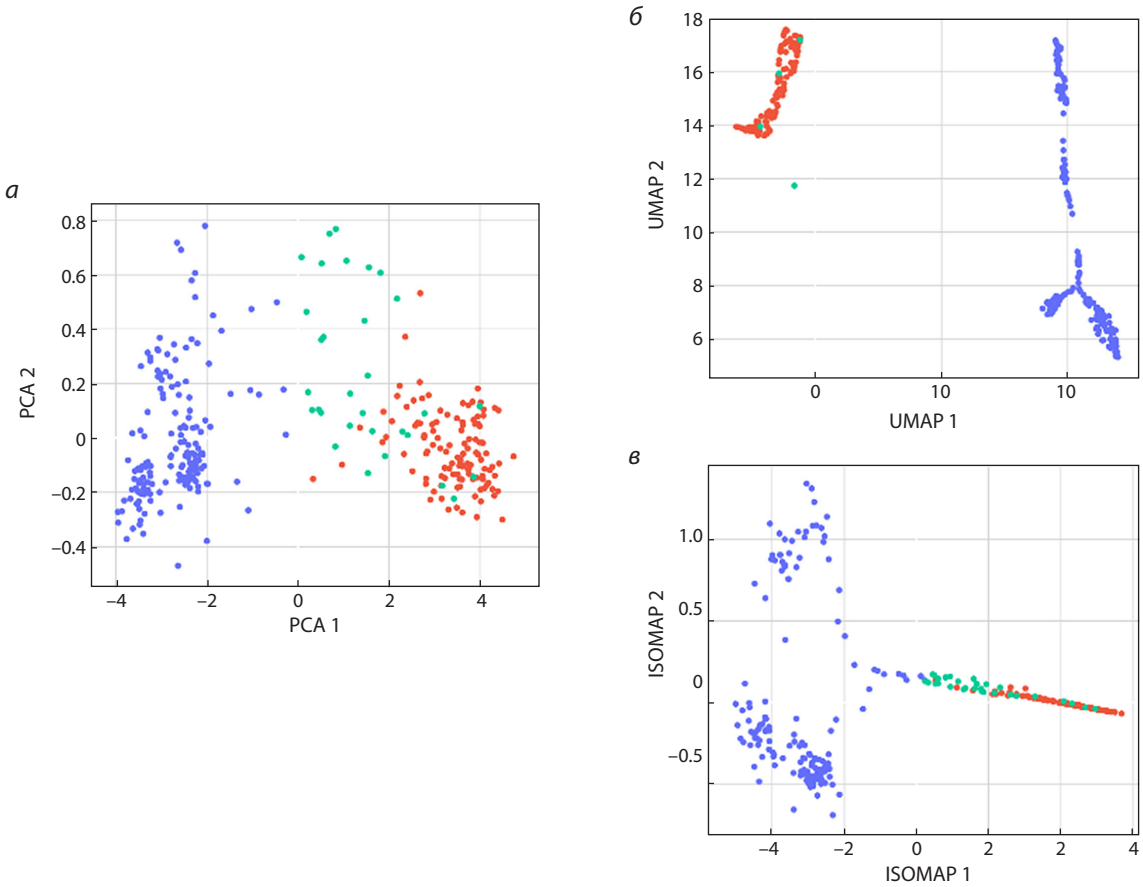


Рис. 5. Визуализация результатов кластеризации с помощью EM-алгоритма. Инициализация выполнена методом *k*-средних в пространстве размерности 15 с использованием методов понижения размерности PCA (*а*), UMAP (*б*) и ISOMAP (*в*).

Синие точки соответствуют зернам, которые не содержат меланин и находятся в первом кластере; красные точки – зернам, содержащим меланин и находящимся во втором кластере; зеленые точки – зернам, которые не содержат меланин и принадлежат ко второму кластеру. Образцы, содержащие меланин, но отнесенные к первому кластеру, отсутствовали.

Таблица 1. Точность кластеризации EM-алгоритмом со случайной инициализацией в пространстве размерности 15 с использованием UMAP-метода понижения размерности

Кластер	Превалирующий класс	Метод понижения размерности	Частота наиболее часто встречаемого класса в кластере
2	С меланином	PCA	0.79
1	Без меланина	PCA	1.00
2	С меланином	UMAP	0.96
1	Без меланина	UMAP	1.00
2	С меланином	ISOMAP	0.80
1	Без меланина	ISOMAP	1.00

Примечание. Превалирующий класс – наиболее часто встречаемый класс образцов в кластере.

Наименее явным образом разделились образцы с пигментом и без него на графике PCA (см. рис. 4, *а*): в районе кластера образцов с меланином (красные точки справа) присутствуют образцы без пигментов (синие точки). Данные образцы при кластеризации (см. рис. 5, *а*) были отнесены ко второму кластеру (зеленые точки). На графике UMAP, напротив, все образцы с пигментом расположились изолированно (см. рис. 4, *б*), слева сверху, в то время как образцы без пигментов образовали группы точек справа. Тем не менее на графике кластеризации (см. рис. 5, *б*) единичные образцы слева были отнесены ко второму кластеру. График ISOMAP (см. рис. 4, *в*) демонстрирует хорошую группировку образцов с меланином, в то время как образцы без пигмента распределились в левой и в меньшей степени в правой части графика, частично перекрываясь с образцами с меланином. При кластеризации (см. рис. 5, *в*) часть этих образцов была отнесена ко второму кластеру (зеленые точки в правой части графика).

Данные табл. 1 численно подтверждают то, что векторы медиан гиперспектральных изображений зерен разных классов (содержащих и не содержащих меланин) при

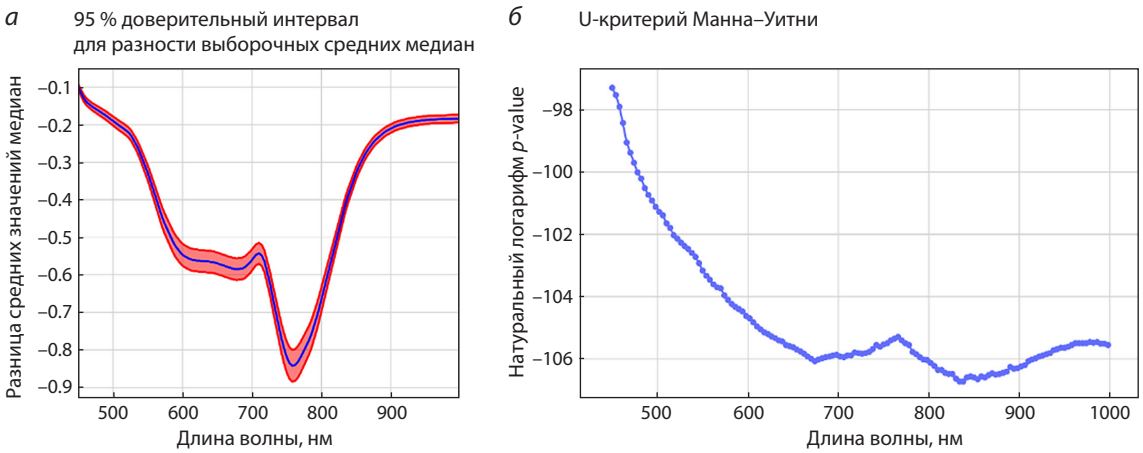


Рис. 6. 95 % доверительный интервал для разности выборочных средних медиан: синяя линия – значения разницы выборочных средних, красная область – 95 % доверительный интервал (*а*); график зависимости логарифма *p*-value для U-критерия Манна–Уитни при оценке разницы средних значений интенсивности отраженного спектра для образцов зерен с меланином и без него для разных интервалов длин волн (*б*).

Таблица 2. Результаты классификации на тестовой выборке в пространстве размерности 15 с использованием PCA, UMAP и ISOMAP для понижения размерности

Модель	Accuracy	F1	Precision	Recall
Логистическая регрессия	0.979	0.971	0.944	1.000
Гребневая регрессия	0.979	0.971	0.944	1.000
Случайный лес	0.979	0.971	0.944	1.000
Градиентный бустинг (catboost)	0.979	0.971	0.944	1.000

Примечание. Для полученной тренировочной и тестовой выборки результаты при использовании разных методов понижения размерности на тестовой выборке были одинаковые.

кластеризации в основном попадают в разные кластеры, что свидетельствует о существовании значимых различий в спектре зерен с пигментом и без него. Нужно отметить, что в первый кластер попали образцы исключительно без меланина.

Статистический анализ

На рис. 6, *а* приведены разности выборочных средних значений интенсивности отраженного излучения для образцов ячменя для всех интервалов длин волн. Как можно отметить, средние значения у разных групп зерен статистически значимо различаются во всем рассматриваемом интервале длин волн. На рис. 6, *б* приведен график зависимости логарифма достоверности различий (*p*-value) от длины волны для U-критерия Манна–Уитни. Данный критерий (с учетом поправки Бонферрони) позволил обнаружить статистически значимые различия для всего изучаемого гиперспектра.

Результаты классификации

Классификация гиперспектральных изображений зерен по содержанию меланина – это задача бинарной классификации. В табл. 2 приведены оценки точности классификации по метрикам accuracy, F1-мера, precision и recall для каждого метода понижения размерности. Размер тестовой выборки – 47 образцов, размер тренировочной выборки – 266 образцов. При обучении использовалась *k*-fold

Рис. 7. Матрица ошибок для тестовой выборки в пространстве размерности 15.

кросс-валидация ($k = 4$); 18 образцов в тестовой выборке содержали меланин; 29 были без меланина; 99 в тренировочной выборке были с меланином, 167 образцов – без этого пигмента.

Исследуемые образцы зерен, помимо меланина, содержали антоцианы, что позволило изучить возможность дифференцировки меланинов и антоцианов. Образцы классифицировали в 15-мерном пространстве, полученном ранее с помощью PCA, с использованием логистической регрессии (266 образцов для обучающей выборки и 47 – для тестовой выборки). В результате ошибки классификации возникали в основном между

классами «без пигментов» и «только с антоцианами», а также при определении образцов, содержащих оба пигмента, и зерен, содержащих только меланин (рис. 7, 8).

На основе результатов статистического анализа для зерен, содержащих только меланин, и зерен с обоими пигментами не было обнаружено статистически значимых различий (p-value < 0.05/138, с учетом поправки Бонферрони) по всему спектру. Наименьшее значение p-value для критерия Манна–Уитни для этих групп было достигнуто при длине волны 774 нм и составило 0.0438 (рис. 9, *а*). Для зерен, содержащих только антоцианы, и зерен без пигментов были обнаружены статистически значимые различия (p-value < 0.05/138 с учетом поправки Бонферрони) в волнах, попадающих в красный и инфракрасный диапазоны (> 714 нм) (см. рис. 9, *б*).

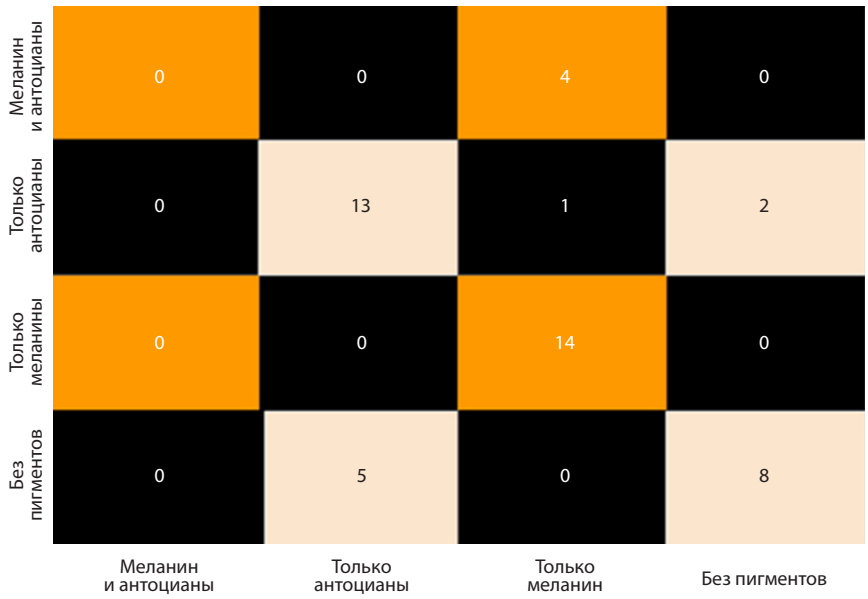


Рис. 8. Матрица ошибок классификации на основе логистической регрессии образцов зерен на четыре класса: содержащих меланин и антоцианы, только антоцианы, только меланин и без пигментов.

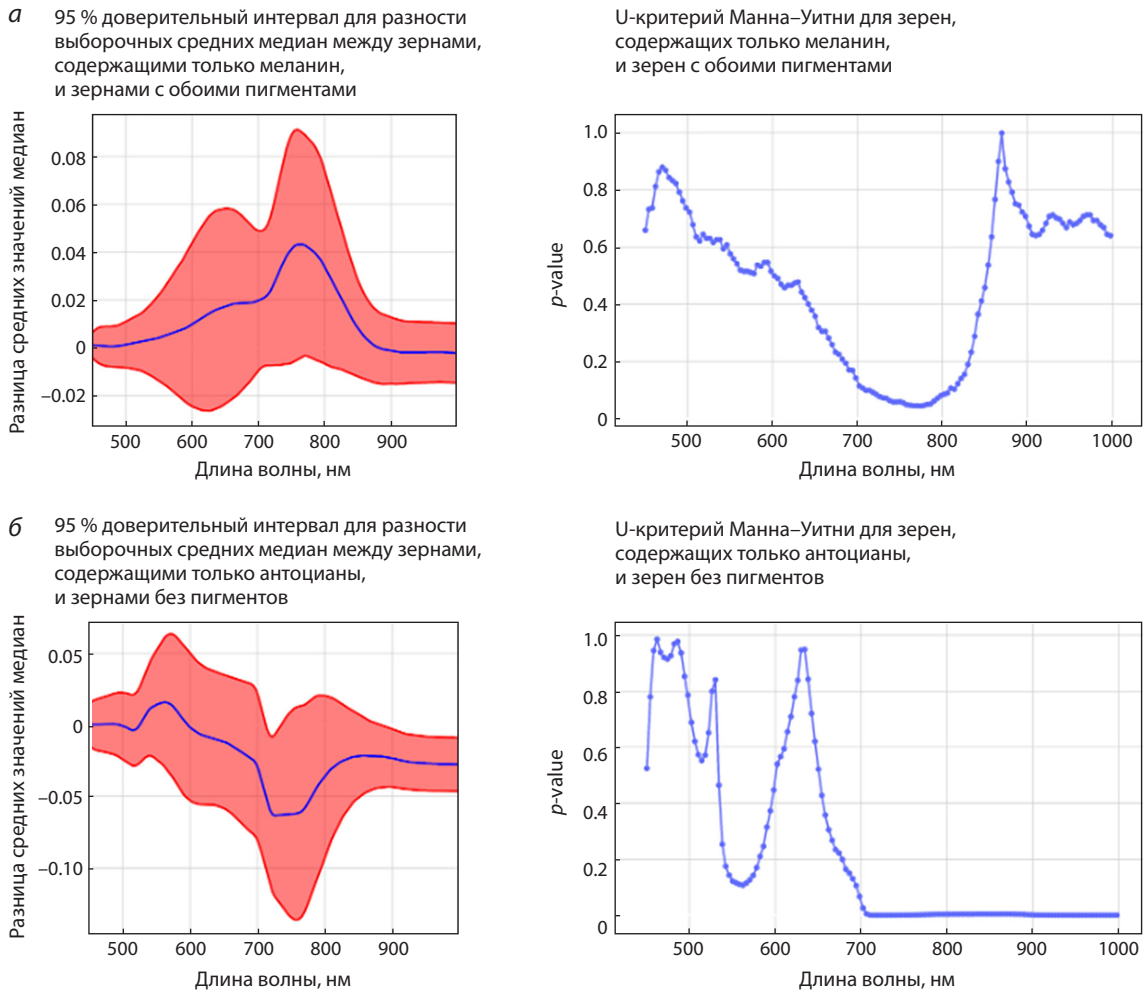


Рис. 9. Графики зависимости логарифма p-value для U-критерия Манна–Уитни при оценке разницы средних значений интенсивности отраженного спектра и 95 % доверительные интервалы для разности выборочных средних медиан.

Обсуждение

Конвейеры в области обработки гиперспектральных изображений

Существует множество современных подходов к автоматизации процесса анализа гиперспектральных данных. Они используют широкий спектр машинного обучения, компьютерного зрения и передовых методов обработки данных. Гиперспектральные изображения характеризуются высокой размерностью, большим объемом данных, подвержены влиянию шума, требуют калибровки и нормализации, в сравнении с RGB-изображениями их сложнее визуализировать. Помимо этого, существует проблема объема обучающих выборок. Для ее решения применяются различные методы увеличения размера обучающих наборов (аугментация). С другой стороны, высокая размерность гиперспектральных данных может легко привести к высокому уровню избыточности данных. Для решения этой проблемы используются алгоритмы ранжирования и фильтрации значимых признаков, а также выбора групп спектров.

Полученные гиперспектральные сырые данные подвергаются предобработке: обнаружению выбросов с помощью анализа главных компонент (PCA), усреднению по группам, масштабированию и центрированию (Yoosefzadeh-Najafabadi et al., 2021), калибровке полученных изображений с использованием эталонных изображений (темного и белого), нормализации, фильтрации Savitzky–Golay, ранжированию и фильтрации параметров для классификации с целью повышения точности и общности моделей (Amanah et al., 2021).

Применение методов понижения размерности может приводить к снижению точности классификации, тем не менее это может быть оправданно в целях повышения общности моделей, чтобы избежать их переобучения. Таким образом, при разработке подходов к решению отдельных задач с использованием гиперспектральных данных требуется многостадийная обработка, реализация которой возможна в архитектуре программных конвейеров, где каждая отдельная стадия заменяема и может быть тщательно настроена и адаптирована.

В настоящее время активно развиваются конвейерные подходы. К примеру, F. Zhu с коллегами (2024) изучали способы предварительной обработки спектральных данных для эффективного снижения влияния различного освещения на оценку хлорофилла в посевах базилика, выращенных при различной интенсивности освещения. Эти исследователи определили оптимальный конвейер анализа данных гиперспектральной визуализации ближнего действия, оценив производительность регрессионного моделирования и получив удовлетворительные карты распределения хлорофилла, согласующиеся с наблюдаемыми различиями в уровнях хлорофилла.

H. Feng с коллегами (2017) создали интегрированный конвейер анализа изображений для автоматической обработки больших объемов гиперспектральных данных. Были построены модели для точного количественного определения четырех пигментов (хлорофилла a, хлорофилла b, общего хлорофилла и каротиноидов) из листьев риса и определены важные группы длин волн (700–760 нм), связанные с этими пигментами. На стадии кущения значения R^2 и средние абсолютные процентные ошибки моделей составляли 0.827–0.928 и 6.94–12.84 % соответственно.

Путем создания четырехэтапного конвейера управления обработкой изображений и анализа данных была оценена применимость гиперспектрального дистанционного зондирования для раннего выявления стресса в результате засухи и заражения галловыми нематодами (root-knot nematodes, RKN) у растений томата (Žibrat et al., 2019). Конвейер включал получение изображений, извлечение данных, предобработку и анализ. Объединив дискриминантный анализ на основе частичных наименьших квадратов и машины опорных векторов с анализом временных рядов, U. Žibrat с коллегами достигли 100 % успеха классификации при определении режима полива и степени заражения. Таким образом, разработка конвейерных решений анализа гиперспектральных данных является активно развивающимся направлением на сегодняшний день.

В представленном в настоящей статье примере анализа гиперспектральных данных также использован конвейерный подход, включающий предобработку и анализ данных с понижением размерности (анализ главных компонент, усреднение по группам, калибровка с использованием эталонных изображений, нормализация, фильтрация Savitzky–Golay). Структура конвейера позволяет применять различные методы понижения размерности: PCA (Jolliffe, 2002), ISOMAP (Balasubramanian, Schwartz, 2002) и UMAP (McInnes et al., 2018) в комбинации с разными методами классификации: логистической регрессией (Norman, Harry, 2007), гребневой регрессией (Norman, Harry, 2007), случайным лесом (Ho, 1995), градиентным бустингом (Prokhorenkova et al., 2018).

Методы классификации изображений растений на основе гиперспектральных данных

Гиперспектральные изображения используются для классификации физиологического состояния растений. T. Zhang с коллегами (2018) исследовали возможность применения методов гиперспектральной визуализации в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне (VIS/NIR, 400–1000 нм) для распознавания жизнеспособных и нежизнеспособных семян пшеницы. Для этого они использовали модели классификации, дискриминантный анализ частичных наименьших квадратов (PLS-DA) и машины опорных векторов (SVM) в сочетании с некоторыми методами предварительной обработки и алгоритмом последовательных проекций (SPA). Результаты показали, что стандартная модель нормальной вариации (SNV)-SPA-PLS-DA имела высокую точность классификации для цельных семян (> 85.2 %) и жизнеспособных семян (> 89.5 %).

Y. Lu с коллегами (2022) смогли достичь точности до 99.6 % при дифференциации пяти сортов конопли и 100 % точности при различении пяти стадий роста и двух органов растения (листьев и цветов) с помощью настольной системы гиперспектральной визуализации в спектральном диапазоне 400–1000 нм и машинного обучения, основанного на регуляризованном линейном дискриминантном анализе.

В работе (da Silva et al., 2024) оценена эффективность пяти алгоритмов ML и чувствительность 90 спектров в задаче прогнозирования содержания азота и пигментов (хлорофилла и каротиноидов) в листьях кукурузы на раз-

ных фенологических стадиях для оптимизации азотных удобрений. При прогнозе содержания хлорофиллов a и b значение коэффициента корреляции Пирсона между предсказанными и наблюдаемыми данными составляло около 0.6, а средняя абсолютная ошибка (MAE) была ниже 0.5. При прогнозировании содержания флавоноидов значение коэффициента корреляции между предсказанными и наблюдаемыми данными составляло около 0.6, а MAE – 0.07. При прогнозировании содержания азота значение коэффициентов корреляции были выше 0.35, а MAE – ниже 2.75.

C. Mo с коллегами (2014) разработали метод оценки жизнеспособности семян перца (*Capsicum annuum* L.) на основе гиперспектральной визуализации в диапазоне 400–700 нм, полученных с использованием синего, зеленого, красного и RGB светодиодного освещения. Для этого была создана модель частичного дискриминантного анализа наименьших квадратов (PLS-DA), основанная на стандартном нормальном варианте светодиодного освещения RGB (400–700 нм), которая обеспечивала точность распознавания от 96.7 до 100 %.

R. Falcioni с коллегами (2023) разработали метод оценки пигментов, таких как хлорофиллы, каротиноиды, антоцианы и флавоноиды, в шести агрономических культурах: кукурузе, сахарном тростнике, кофе, рапсе, пшенице и табаке, на базе гиперспектральных данных. Кластеризация, основанная на анализе главных компонент (PCA), и анализ коэффициента Каппа позволили получить точность (accuracy и precision) от 92 до 100 % в области ультрафиолета (UV-VIS), ближнем инфракрасном (NIR) и коротковолновом инфракрасном (SWIR) диапазонах.

В нашем исследовании мы получили довольно высокие значения точности: accuracy = 0.979, F1-мера = 0.971 с precision = 0.944 и recall = 1.000 для всех моделей предсказания, что является сравнимым с аналогичными показателями в других работах, в частности, описанных выше. Полученные оценки были одинаковыми для всех моделей, вероятно, в силу того, что выборка имела небольшой размер и была однородной. В результате чего при получившемся разбиении все модели на тестовой выборке совершили одну ошибку, неверно классифицировав один образец. С другой стороны, это свидетельствует о высокой устойчивости предсказаний на основе гиперспектральных данных и предложенных моделей.

В нашей предыдущей статье (Комышев и др., 2023) разработан метод оценки присутствия антоцианов и меланина в оболочке зерна ячменя на основе анализа цифровых RGB изображений с помощью компьютерного зрения и алгоритмов машинного обучения. Мы задействовали схожий протокол получения изображений с использованием чашек Петри для зерен, но съемка производилась обычной RGB камерой. Образцы были взяты из аналогичной коллекции. При этом лучшую точность (accuracy = 0.821) показала модель сети U-Net, основанная на топологии EfficientNetB0. Таким образом, даже при применении методов глубокого машинного обучения точность классификации оказалась ниже, чем в настоящей работе. Можно заключить, что гиперспектральные изображения позволяют проводить более точную классификацию зерен растений по содержанию пигментов с помощью менее ресурсозатратных методов «мелкого» машинного обучения.

Мы изучили влияние присутствия антоцианов на точность определения меланина в образцах ячменя, содержащих антоцианы. Она оказалась меньше (accuracy = 0.95) в сравнении с образцами без этого пигмента (accuracy = 1) (см. рис. 8). Таким образом, присутствие антоцианов незначительно снижает точность определения меланина в образцах.

Возможность дифференцировать образцы только с меланином от образцов с меланином и антоцианами оказалась слабой (см. рис. 9, *а*). Определение антоцианов на основе полученных гиперспектральных данных, по-видимому, вероятно с высокой точностью благодаря спектру в волнах, попадающих в красный и инфракрасный диапазоны (> 714 нм) (см. рис. 9, *б*). Таким образом, данный подход дает возможность дифференцировать зерна без пигментов от зерен с антоцианами, но не позволяет определить присутствие антоцианов в образцах с меланином.

Наша цель заключалась в изучении возможности различения образцов семян, содержащих и не содержащих меланин, с помощью только гиперспектральных данных. Мы также опробовали несколько подходов, состоящих из взаимозаменяемых методов, которые формируют типичный конвейер обработки гиперспектральных данных, и сформировали его в виде программного инструмента. Этот программный инструмент может быть использован для быстрого построения алгоритма анализа гиперспектральных данных, включающих основные этапы обработки данных, такие как загрузка изображений, предобработка, анализ и визуализация.

Заключение

Визуализация на основе методов PCA, UMAP и ISOMAP, а также кластеризация в пространстве размерности 15 показали, что на основе гиперспектральных изображений образцы ячменя с меланином и без него можно разделить на два соответствующих класса с высокой точностью. Анализ выявил статистически значимые различия в распределении интенсивности отраженного излучения для этих образцов для всех линий гиперспектра.

Преимущества применения разработанного конвейера перед классическими и более точными биохимическими методами решения задачи классификации: малые временные и трудовые затраты, объективность полученных результатов. В данной версии пакета для классификации не использованы нейронные сети/методы глубокого машинного обучения. Недостатками нейросетевых подходов перед реализованными в конвейере методами могут быть сложная интерпретируемость результатов предсказаний, а также необходимость в обучающей выборке очень большого объема.

В настоящей работе был создан вычислительный конвейер на языке Python с открытым исходным кодом для анализа гиперспектральных изображений, который включает в себя визуализацию в двухмерном пространстве, кластеризацию, базовый статистический анализ и классификацию. Предложенный программный пакет может существенно снизить временные затраты в исследованиях, включающих анализ гиперспектральных изображений. Конвейер был протестирован в задаче исследования влияния меланина на гиперспектр зерен ячменя.

Список литературы / References

Афонников Д.А., Генаев М.А., Дорошков А.В., Комышев Е.Г., Пшеничникова Т.А. Методы высокопроизводительного фенотипирования растений для массовых селекционно-генетических экспериментов. *Генетика.* 2016;52(7):788-803. DOI 10.7868/S001667581607002X
[Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. *Russ. J. Genet.* 2016;52(7):688-701. DOI 10.1134/S1022795416070024]

Глаголева А.Ю., Новокрещёнов Л.А., Шоева О.Ю., Ковалева О.Н., Хлесткина Е.К. Изучение разнообразия окраски зерновки ячменя в коллекции ВИР. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции.* 2022;183(3):76-84. DOI 10.30901/2227-8834-2022-3-76-84
[Glagoleva A.Y., Novokreschyonov L.A., Shoeva O.Y., Kovaleva O.N., Khlestkina E.K. Studying grain color diversity in the barley collection of VIR. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 2022;183(3):76-84. DOI 10.30901/2227-8834-2022-3-76-84 (in Russian)]

Комышев Е.Г., Генаев М.А., Бусов И.Д., Кожекин М.В., Артеменко Н.В., Глаголева А.Ю., Коваль В.С., Афонников Д.А. Определение содержания меланина и антоцианов в зернах ячменя на основе анализа цифровых изображений методами машинного обучения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):859-868. DOI 10.18699/VJGB-23-99
[Komyshev E.G., Genaev M.A., Busov I.D., Kozhekin M.V., Artemenko N.V., Glagoleva A.Y., Koval V.S., Afonnikov D.A. Determination of the melanin and anthocyanin content in barley grains by digital image analysis using machine learning methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):859-868. DOI 10.18699/VJGB-23-99 (in Russian)]

Крупнов В.А. Генетическая сложность и контекст-специфичность признаков урожая пшеницы в засушливых условиях. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2013;17(3):524-534
[Krupnov V.A. Genetic complexity and context specificity of traits improving wheat yield under drought conditions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013;17(3):524-534 (in Russian)]

Чешкова А.Ф. Обзор современных методов обнаружения и идентификации болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):202-213. DOI 10.18699/VJGB-22-25
[Cheshkova A.F. A review of hyperspectral image analysis techniques for plant disease detection and identification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(2):202-213. DOI 10.18699/VJGB-22-25 (in Russian)]

Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369
[Shoeva O.Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):333-342. DOI 18699/VJ18.369 (in Russian)]

Afonnikov D.A., Komyshev E.G., Efimov V.M., Genaev M.A., Koval V.S., Gierke P.U., Börner A. Relationship between the characteristics of bread wheat grains, storage time and germination. *Plants.* 2021;11(1):35. DOI 10.3390/plants11010035

Amanah H.Z., Wakholi C., Perez M., Faqeerzada M.A., Tunny S.S., Masithoh R.E., Choung M.G., Kim K.H., Lee W.H., Cho B.K. Near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) for nondestructive prediction of anthocyanins content in black rice seeds. *Appl. Sci.* 2021;11(11):4841. DOI 10.3390/app11114841

Ambrose A., Kandpal L.M., Kim M.S., Lee W.H., Cho B.K. High speed measurement of corn seed viability using hyperspectral imaging. *Infrared Phys. Technol.* 2016;75:173-179. DOI 10.1016/j.infrared.2015.12.008

Baek I., Kim M.S., Cho B.K., Mo C., Barnaby J.Y., McClung A.M., Oh M. Selection of optimal hyperspectral wavebands for detection of discolored, diseased rice seeds. *Appl. Sci.* 2019;9(5):1027. DOI 10.3390/app9051027

Balasubramanian M., Schwartz E.L. The isomap algorithm and topological stability. *Science.* 2002;295(5552):7. DOI 10.1126/science.295.5552.7a

Becht E., McInnes L., Healy J., Dutertre C.A., Kwok I.W., Ng L.G., Ginhoux F., Newell E.W. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat. Biotechnol*. 2019;37(1):38-44. DOI 10.1038/nbt.4314

Cormen T.H., Leiserson C.E., Rivest R.L., Stein C. Introduction to Algorithms. Cambridge, Massachusetts: The MIT Press, 2022

da Silva B.C., de Mello Prado R., Baio F.H.R., Campos C.N.S., Teodoro L.P.R., Teodoro P.E., Santana D.C., Fernandes T.F.S., da Silva J.C.A., de Souza Loureiro E. New approach for predicting nitrogen and pigments in maize from hyperspectral data and machine learning models. *Remote Sens. Appl. Soc. Environ*. 2024;33:101110. DOI 10.1016/j.rsase.2023.101110

da Silva Medeiros M.L., Cruz-Tirado J.P., Lima A.F., de Souza Netto J.M., Ribeiro A.P.B., Bassegio D., Godoy H.T., Barbin D.F. Assessment oil composition and species discrimination of *Brassicas* seeds based on hyperspectral imaging and portable near infrared (NIR) spectroscopy tools and chemometrics. *J. Food Compos. Anal.* 2022;107:104403. DOI 10.1016/j.jfca.2022.104403

Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the *EM* algorithm. *J. R. Statist. Soc. B.* 1977;39(1):1-22. DOI 10.1111/j.2517-6161.1977.tb01600.x

Díaz-Martínez V., Orozco-Sandoval J., Manian V., Dhatt B.K., Walia H. A deep learning framework for processing and classification of hyperspectral rice seed images grown under high day and night temperatures. *Sensors.* 2023;23(9):4370. DOI 10.3390/s23094370

ElMasry G., Mandour N., Ejeez Y., Demilly D., Al-Rejaie S., Verdier J., Belin E., Rousseau D. Multichannel imaging for monitoring chemical composition and germination capacity of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds during development and maturation. *Crop J.* 2022;10(5):1399-1411. DOI 10.1016/j.cj.2021.04.010

Fakthongphan J., Graybosch R.A., Baenziger P.S. Combining ability for tolerance to pre-harvest sprouting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 2016;56(3):1025-1035. DOI 10.2135/cropsci2015.08.0490

Falcioni R., Antunes W.C., Demattê J.A.M., Nanni M.R. Reflectance spectroscopy for the classification and prediction of pigments in agronomic crops. *Plants.* 2023;12(12):2347. DOI 10.3390/plants12122347

Feng H., Chen G., Xiong L., Liu Q., Yang W. Accurate digitization of the chlorophyll distribution of individual rice leaves using hyperspectral imaging and an integrated image analysis pipeline. *Front. Plant Sci*. 2017;8:1238. DOI 10.3389/fpls.2017.01238

Flintham J., Adlam R., Bassoi M., Holdsworth M., Gale M. Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat. *Euphytica.* 2002;126:39-45. DOI 10.1023/A:1019632008244

Gao T., Chandran A.K.N., Paul P., Walia H., Yu H. HyperSeed: an end-to-end method to process hyperspectral images of seeds. *Sensors.* 2021;21(24):8184. DOI 10.3390/s21248184

Glagoleva A.Y., Shmakov N.A., Shoeva O.Y., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Börner A., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the *Black lemma* and pericarp (*Blp*) gene. *BMC Plant Biol.* 2017;17(Suppl. 1):182. DOI 10.1186/s12870-017-1124-1

Gowen A.A., O'Donnell C.P., Cullen P.J., Downey G., Frias J.M. Hyperspectral imaging – an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends Food Sci. Technol.* 2007;18(12):590-598. DOI 10.1016/j.tifs.2007.06.001

Greenwood P.E., Nikulin M.S. A Guide to Chi-Squared Testing. New York: Wiley, 1996;196-202

Hancock J.T., Khoshgoftaar T.M. CatBoost for big data: an interdisciplinary review. *J. Big Data.* 2020;7(1):94. DOI 10.1186/s40537-020-00369-8

Hao J., Ho T.K. Machine learning made easy: a review of *Scikit-learn* package in python programming language. *J. Educ. Behav. Stat.* 2019;44(3):348-361. DOI 10.3102/1076998619832248

He X., Feng X., Sun D., Liu F., Bao Y., He Y. Rapid and nondestructive measurement of rice seed vitality of different years using near-infrared hyperspectral imaging. *Molecules.* 2019;24(12):2227. DOI 10.3390/molecules24122227

Ho T.K. Random decision forests. In: Proceedings of the Third International Conference on Document Analysis and Recognition. 1995;1: 278-282. DOI 10.1109/ICDAR.1995.598994

Howse J. OpenCV Computer Vision with Python. Birmingham: Packt Publishing, 2013

Jin B., Qi H., Jia L., Tang Q., Gao L., Li Z., Zhao G. Determination of viability and vigor of naturally-aged rice seeds using hyperspectral imaging with machine learning. *Infrared Phys. Technol.* 2022; 122:104097. DOI 10.1016/j.infrared.2022.104097

Jolliffe I.T. Principal component analysis for special types of data. In: Principal Component Analysis. Springer Series in Statistics. New York, NY: Springer, 2002;338-372. DOI 10.1007/0-387-22440-8_13

Kandpal L.M., Lohumi S., Kim M.S., Kang J.S., Cho B.K. Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds. *Sens. Actuators B.* 2016;229:534-544. DOI 10.1016/j.snb.2016.02.015

Khlestkina E.K. Current applications of wheat and wheat-alien precise genetic stocks. *Mol. Breed.* 2014;34(2):273-281. DOI 10.1007/s11032-014-0049-8

Lachman J., Martinek P., Kotíková Z., Orsák M., Šulc M. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain. A review. *J. Cereal Sci*. 2017;74:145-154. DOI 10.1016/j.jcs.2017.02.007

Liu C., Huang W., Yang G., Wang Q., Li J., Chen L. Determination of starch content in single kernel using near-infrared hyperspectral images from two sides of corn seeds. *Infrared Phys. Technol.* 2020; 110:103462. DOI 10.1016/j.infrared.2020.103462

Lu Y., Young S., Linder E., Whipker B., Suchoff D. Hyperspectral imaging with machine learning to differentiate cultivars, growth stages, flowers, and leaves of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Front. Plant Sci*. 2022;12:810113. DOI 10.3389/fpls.2021.810113

Ma T., Tsuchikawa S., Inagaki T. Rapid and non-destructive seed viability prediction using near-infrared hyperspectral imaging coupled with a deep learning approach. *Comput. Electron. Agric.* 2020;177: 105683. DOI 10.1016/j.compag.2020.105683

Machálková L., Janečková M., Hřivna L., Dostálová Y., Hernandez K., Joany L., Mrkvicová E., Vyhnánek T., Trojan V. Impact of added colored wheat bran on bread quality. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 2017;65(1):99-104. DOI 10.11118/actaun201765010099

Matzrafi M., Herrmann I., Nansen C., Kliper T., Zait Y., Ignat T., Siso D., Rubin B., Karnieli A., Eizenberg H. Hyperspectral technologies for assessing seed germination and trifloxysulfuron-methyl response in *Amaranthus palmeri* (Palmer amaranth). *Front. Plant Sci.* 2017;8:474. DOI 10.3389/fpls.2017.00474

McInnes L., Healy J., Melville J. Umap: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. *ArXiv.* 2018;1802. 03426. DOI 10.48550/arXiv.1802.03426

Mo C., Kim G., Lee K., Kim M.S., Cho B.K., Lim J., Kang S. Non-destructive quality evaluation of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using LED-induced hyperspectral reflectance imaging. *Sensors*. 2014;14(4):7489-7504. DOI 10.3390/s140407489

Norman R.D., Harry S. Applied Regression Analysis. Williams, 2007

Nunez-Iglesias J., Van der Walt S., Dashnow H. Elegant SciPy: The Art of Scientific Python. Sebastopol, CA: O'Reilly Media, 2017

Prokhorenkova L., Gusev G., Vorobev A., Dorogush A.V., Gulin A. CatBoost: unbiased boosting with categorical features. In: Proceedings of the 32nd International Conference on Neural Information Processing Systems. Red Hook, NY: Curran Associates Inc., 2018; 6639-6649

Qin J., Chao K., Kim M.S., Lu R., Burks T.F. Hyperspectral and multispectral imaging for evaluating food safety and quality. *J. Food Eng.* 2013;118(2):157-171. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2013.04.001

Reddy P., Panozzo J., Guthridge K.M., Spangenberg G.C., Rochfort S.J. Single seed near-infrared hyperspectral imaging for classification of perennial ryegrass seed. *Sensors.* 2023;23(4):1820. DOI 10.3390/s23041820

Savitzky A., Golay M.J. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 1964;36(8):1627-1639. DOI 10.1021/ac60214a047

Serrano L., Filella I., Penuelas J. Remote sensing of biomass and yield of winter wheat under different nitrogen supplies. *Crop Sci*. 2000; 40(3):723-731. DOI 10.2135/cropsci2000.403723x

Stančin I., Jović A. An overview and comparison of free Python libraries for data mining and big data analysis. In: 42nd International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO). IEEE, 2019;977-982. DOI 10.23919/MIPRO.2019.8757088

Wakholi C., Kandpal L.M., Lee H., Bae H., Park E., Kim M.S., Mo C., Lee W.H., Cho B.K. Rapid assessment of corn seed viability using short wave infrared line-scan hyperspectral imaging and chemometrics. *Sens. Actuators B.* 2018;255:498-507. DOI 10.1016/j.snb.2017.08.036

Weber V.S., Araus J.L., Cairns J.E., Sanchez C., Melchinger A.E., Orsini E. Prediction of grain yield using reflectance spectra of canopy and leaves in maize plants grown under different water regimes. *Field Crops Res.* 2012;128:82-90. DOI 1016/j.fcr.2011.12.016

Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. In: Kotz S., Johnson N.L. (Eds.). Breakthroughs in Statistics. Springer Series in Statistics. New York, NY: Springer, 1992;196-202. DOI 10.1007/978-1-4612-4380-9_16

Yang G., Wang Q., Liu C., Wang X., Fan S., Huang W. Rapid and visual detection of the main chemical compositions in maize seeds based on Raman hyperspectral imaging. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc*. 2018;200:186-194. DOI 10.1016/j.saa.2018.04.026

Yoosefzadeh-Najafabadi M., Earl H.J., Tulpan D., Sulik J., Eskandari M. Application of machine learning algorithms in plant breeding: predicting yield from hyperspectral reflectance in soybean. *Front. Plant Sci.* 2021;11:624273. DOI 10.3389/fpls.2020.624273

Zahavi A., Palshin A., Liyanage D.C., Tamre M. Influence of illumination sources on hyperspectral imaging. In: 20th International Conference on Research and Education in Mechatronics (REM). Wels, Austria, 2019;1-5. DOI 10.1109/REM.2019.8744086

Zhang X., He Y. Rapid estimation of seed yield using hyperspectral images of oilseed rape leaves. *Ind. Crops Prod.* 2013;42:416-420. DOI 10.1016/j.indcrop.2012.06.021

Zhang T., Wei W., Zhao B., Wang R., Li M., Yang L., Wang J., Sun Q. A reliable methodology for determining seed viability by using hyperspectral data from two sides of wheat seeds. *Sensors*. 2018; 18(3):813. DOI 10.3390/s18030813

Zhu F., Qiao X., Zhang Y., Jiang J. Analysis and mitigation of illumination influences on canopy close-range hyperspectral imaging for the *in situ* detection of chlorophyll distribution of basil crops. *Comput. Electron. Agric*. 2024;217:108553. DOI 10.1016/j.compag.2023.108553

Žibrat U., Susič N., Knapič M., Širca S., Strajnar P., Razinger J., Vončina A., Urek G., Stare B.G. Pipeline for imaging, extraction, preprocessing, and processing of time-series hyperspectral data for discriminating drought stress origin in tomatoes. *MethodsX*. 2019; 6:399-408. DOI 10.1016/j.mex.2019.02.022

Zou Z., Chen J., Wu W., Luo J., Long T., Wu Q., Wang Q., Zhen J., Zhao Y., Wang Y., Chen Y., Zhou M., Xu L. Detection of peanut seed vigor based on hyperspectral imaging and chemometrics. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1127108. DOI 10.3389/fpls.2023.1127108

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.07.2023. После доработки 22.03.2024. Принята к публикации 26.03.2024.

Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(4):456-462

DOI 10.18699/vjgb-24-51

Использование метода BLUP для оценки селекционной ценности образцов мягкой яровой пшеницы по содержанию микро- и макроэлементов в зерне

Н.А. Потапова [1, 2, 3#], А.С. Злобин [1#], И.Н. Леонова [4], Е.А. Салина [1], Я.А. Цепилов [1]

[1] Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
[2] Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, Россия
[3] Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия
[4] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
nadezhdalpotapova@gmail.com; tsepilov@bionet.nsc.ru

Аннотация. Геномная селекция – это технология, позволяющая определять генетическую ценность сортов сельскохозяйственных растений и пород животных, опираясь на информацию о генотипах и фенотипах. Измеренная селекционная ценность по отношению к целевому признаку дает возможность грамотно планировать этапы селекции и выбирать подходящие для скрещивания родительские формы. В настоящей работе использован метод BLUP для оценки селекционной ценности 149 российских сортов и интрогрессивных линий (4 измерения для каждого сорта или линии, 596 фенотипических точек) яровой пшеницы по содержанию семи химических элементов в зерне – K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu. Качество оценки селекционной ценности было определено с помощью кросс-валидации методом случайного разделения выборки на пять частей, одна из которых выступала в качестве тестовой популяции. Средние значения коэффициента корреляции Пирсона для предсказания концентрации микроэлементов составили: K – 0.67, Ca – 0.61, Mg – 0.4, Mn – 0.5, Fe – 0.38, Zn – 0.46, Cu – 0.48. Для 28 из 35 исследуемых моделей значение *p*-value было ниже номинального значимого порога (*p*-value < 0.05). Для 11 моделей *p*-value было значимо после коррекции на множественное тестирование (*p*-value < 0.001). Четыре из пяти моделей для Ca и K, и две из пяти для Mn имели *p*-value ниже порога, поправленного на множественное тестирование. Для 30 сортов, показавших лучшие значения сортовой ценности, средняя селекционная ценность для Ca, K и Mn была выше на 296.43, 785.11 и 4.87 мг/кг соответственно, чем средняя селекционная ценность популяции. Полученные результаты демонстрируют возможность применения моделей геномной селекции на ограниченных по размеру выборках образцов. Модели для K, Ca и Mn, показавшие наилучший результат, пригодны для оценки селекционной ценности российских сортов пшеницы для данных признаков.

Ключевые слова: геномная селекция; BLUP; пшеница; микроэлементы; макроэлементы.

Для цитирования: Потапова Н.А., Злобин А.С., Леонова И.Н., Салина Е.А., Цепилов Я.А. Использование метода BLUP для оценки селекционной ценности образцов мягкой яровой пшеницы по содержанию микро- и макроэлементов в зерне. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):456-462. DOI 10.18699/vjgb-24-51

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-16-00041, https://rscf.ru/project/23-16-00041/).

Благодарности. Растительный материал выращен в ЦКП репродукции растений ИЦиГ СО РАН при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0017.

The BLUP method in evaluation of breeding values of Russian spring wheat lines using micro- and macroelements in seeds

N.A. Potapova [1, 2, 3#], A.S. Zlobin [1#], I.N. Leonova [4], E.A. Salina [1], Y.A. Tsepilov [1]

[1] Kurchatov Genomic Center of ICG of SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia
[3] Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia
[4] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
nadezhdalpotapova@gmail.com; tsepilov@bionet.nsc.ru

Abstract. Genomic selection is a technology that allows for the determination of the genetic value of varieties of agricultural plants and animal breeds, based on information about genotypes and phenotypes. The measured breeding value (BV) for varieties and breeds in relation to the target trait allows breeding stages to be thoroughly planned and the parent forms suitable for crossing to be chosen. In this work, the BLUP method was used to assess the breeding va-

© Потапова Н.А., Злобин А.С., Леонова И.Н., Салина Е.А., Цепилов Я.А., 2024

Авторы внесли равный вклад в работу

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

lue of 149 Russian varieties and introgression lines (4 measurements for each variety or line, 596 phenotypic points) of spring wheat according to the content of seven chemical elements in the grain – K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu. The quality of the evaluation of breeding values was assessed using cross-validation, when the sample was randomly divided into five parts, one of which was chosen as a test population. The following average values of the Pearson correlation were obtained for predicting the concentration of trace elements: K – 0.67, Ca – 0.61, Mg – 0.4, Mn – 0.5, Fe – 0.38, Zn – 0.46, Cu – 0.48. Out of the 35 models studied, the *p*-value was below the nominal significant threshold (*p*-value < 0.05) for 28 models. For 11 models, the p-value was significant after correction for multiple testing (*p*-value < 0.001). For Ca and K, four out of five models and for Mn two out of five models had a *p*-value below the threshold adjusted for multiple testing. For 30 varieties that showed the best varietal values for Ca, K and Mn, the average breeding value was 296.43, 785.11 and 4.87 mg/kg higher, respectively, than the average breeding value of the population. The results obtained show the relevance of the application of genomic selection models even in such limited-size samples. The models for K, Ca and Mn are suitable for assessing the breeding value of Russian wheat varieties based on these characteristics.
Key words: genomic selection; BLUP; wheat; microelements; macroelements.

For citation: Potapova N.A., Zlobin A.S., Leonova I.N., Salina E.A., Tsepilov Y.A. The BLUP method in evaluation of breeding values of Russian spring wheat lines using micro- and macroelements in seeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):456-462. DOI 10.18699/vjgb-24-51

Введение

С незапамятных времен для выведения новых сортов сельскохозяйственных растений и пород животных применяются методы классической селекции, основанные на гибридизации образцов, обладающих хозяйственно ценными признаками с последующим отбором по фенотипу. С развитием технологий секвенирования генома, методов разработки молекулярных маркеров стало возможным использовать различия в структуре генотипов, находить ассоциации маркер–признак и применять полученную информацию для выявления связи между генотипическими полиморфизмами и фенотипическими вариациями. Из новых подходов, которые активно разрабатываются, для растений можно выделить маркер-ориентированную селекцию (MAS, marker-assisted selection) и геномную селекцию (GS, genomic selection) (Charmet, Storlie, 2012; Bhat et al., 2016; Bartholomé et al., 2022; Miller et al., 2023). Эти же методы используются и для животных (Кузнецов, 1999; Melucci et al., 2009; Суслина и др., 2019; Столповский и др., 2020; Жуманов и др., 2021; Johnsson, 2023).

Несмотря на то что MAS достаточно эффективна для поиска и интродукции генов с высоким вкладом в фенотипическое проявление признака, основной недостаток метода – низкая точность прогнозирования признаков с количественным наследованием. В качестве альтернативы MAS и преодоления ограничений этого метода была предложена геномная селекция, одно из главных преимуществ которой – использование прогностических моделей для оценки селекционной ценности.

Среди основных подходов для геномной селекции можно выделить группу методов BLUP (best linear unbiased prediction – лучший линейный несмещенный прогноз) (Charmet, Storlie, 2012; Hoffstetter et al., 2016; Lozada, Carter, 2020; Plavšin et al., 2022), группу байесовских методов (Juliana et al., 2022) и группу методов, в которых используется машинное обучение (Wang et al., 2018). Также применяются и методы индексов (Lopez-Cruz et al., 2020). Методы геномной селекции в области сельского хозяйства позволяют изменить и повысить аккуратность подхода к выведению новых сортов растений и пород животных.

Значительные выгоды от применения GS показаны в животноводстве из-за высокой стоимости воспроизводства потомства. Внедрение GS для производства сельскохозяйственных культур началось существенно позднее, однако к настоящему времени подходы и потенциал GS были исследованы у основных сельскохозяйственных культур, таких как пшеница, кукуруза, ячмень и соя.

Пшеница играет важную роль в продовольственной безопасности во всем мире. Помимо питательных компонентов, в зернах пшеницы содержатся такие элементы, как кальций, цинк, магний и другие. Дефицит элементов, также известный как «скрытый голод», возникает в результате потребления пищи с низкой концентрацией элементов и витаминов (Liu et al., 2019) и может приводить к различным заболеваниям и даже смерти. По этой причине возможность грамотно подходить к селекции сортов пшеницы и увеличивать концентрацию необходимых элементов в зерне является важным способом борьбы с дефицитом необходимых для здоровья питательных элементов во всем мире.

Методы геномной селекции применяются для различных популяций и сортов пшеницы относительно разнообразных признаков: от содержания элементов в зерне и урожайности до устойчивости к заболеваниям (Hoffstetter et al., 2016). Наиболее активно используются метод BLUP и его различные модификации: rrBLUP, gBLUP, egBLUP, wBLUP и другие (Zhao et al., 2014; Martini et al., 2017; Berkner et al., 2022; Rabieyan et al., 2022). Этот метод зарекомендовал себя за несколько десятилетий использования в селекции растений и животных. Также используются байесовский метод и его модификации: BRR (Bayesian Ridge regression, байесовская гребневая регрессия), BL (Bayesian Lasso, байесовское лассо), BA (Bayes A), BB (Bayes B), BC (Bayes C). Относительно недавно стали применяться методы машинного обучения и глубокого обучения в геномной селекции пшеницы (Sandhu et al., 2021a, b; Sirsat et al., 2022). Проведенные сравнения результатов между методами показали, что в целом они пересекаются, и общепринятые методы группы BLUP ничем не уступают байесовским методам и методам машинного обучения (Tsai et al., 2020; Berkner et al., 2022; Juliana et al., 2022).

Ранее нами с использованием панели сортов и интрогрессивных линий мягкой пшеницы было проведено ассоциативное картирование генетических факторов, определяющих содержание семи химических элементов в зер-

не пшеницы (Potapova et al., 2023). Исследование выявило значимо ассоциированные маркеры и показало возможный потенциал применения BLUP для данных признаков.

Целью настоящей работы было исследование селекционной ценности образцов этой панели по содержанию химических элементов и получение несмещенных оценок эффектов генетических полиморфизмов для определения селекционной ценности других российских сортов. По содержанию в организме человека элементы делятся на макроэлементы (содержание составляет сотые доли процента и более), микроэлементы (содержание от стотысячных до тысячных долей процента) и ультрамикроэлементы (миллионные доли процента и менее). Из семи анализируемых элементов к макроэлементам относятся кальций, калий и магний, к микроэлементам – железо, марганец, медь и цинк.

Материалы и методы

В исследовании была использована панель из 157 российских сортов и интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы. Список растительного материала, информация о происхождении образцов и условия фенотипирования доступны в работах (Leonova et al., 2020; Potapova et al., 2023).

Генотипирование образцов маркерами SNP проводили с помощью платформы Illumina Infinium 15 K (TraitGenetics Section, Германия; www.sgs-institut-fresenius.de). После выравнивания маркеров на референсный геном пшеницы для определения их расположения (хромосома и позиция), проверки контроля качества и последующей фильтрации данных (качество генотипирования ОНП <5 %, частота минорного аллеля <1 %, качество генотипирования образцов <5 %) осталось 149 линий пшеницы и 11 405 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП). Подробная информация об анализе генотипов доступна в работе (Potapova et al., 2023).

Содержание микро- и макроэлементов (Zn, Mg, Mn, Ca, Cu, Fe и K) определяли методом атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенным распылением на приборе Contra 800 D (Analytik Jena, Германия), как описано в работе (Potapova et al., 2023). Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программного комплекса Statistica v.10.0.

Содержание химических элементов оценивали с использованием семенного материала коллекции, культивируемой в полевых условиях 2018–2019 гг., при этом выполняли четыре измерения, по два на каждый год. Наследуемость была рассчитана по формуле: V(G)/V(P) в программе plink (v.1.90b6.26) (Purcell et al., 2007).

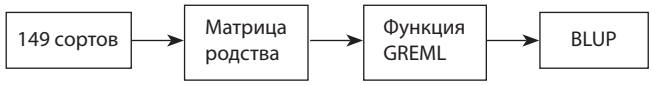


Рис. 1. Схема анализа.

Для каждого из данных фенотипов (содержание элемента в зерне) были получены средние значения среди четырех точек измерения. Эти значения были использованы в дальнейшем анализе.

BLUP и кросс-валидация. Для каждого химического элемента осуществляли анализ, основная схема которого представлена на рис. 1.

Для 149 сортов была оценена генетическая матрица родства для ОНП с качеством генотипирования выше 98 % с помощью программного обеспечения GCTA (версия 1.94) (Yang et al., 2011). Затем были получены значения селекционной ценности для каждого из образцов с использованием параметра --reml-pred-rand из GCTA. Данная функция измеряет дисперсию признака, объясненную всеми анализируемыми ОНП. Для расчета значения СЦ (селекционная ценность) для каждого из ОНП по отдельности была использована функция --blup-snp из GCTA.

Для проверки обоснованности полученных результатов была задействована модель с применением метода k-блочной кросс-валидации (k-fold cross-validation) (рис. 2).

Выборка из 149 образцов была разделена на пять подвыборок случайным образом. Каждая из подвыборок единожды выступала в качестве тестовой популяции, в то время как остальные четыре подвыборки были в качестве тренировочной популяции. Таким образом, для каждого из химических элементов было использовано пять моделей по получению коэффициентов ОНП для оценки селекционной ценности по содержанию элемента в пшенице. В каждом случае в тренировочной выборке было 119 сортов, а в тестовой – 30 сортов.

Оценка селекционной ценности была проведена с помощью программного обеспечения GCTA, как описано выше. Далее были получены коэффициенты однонуклеотидных полиморфизмов для оценки селекционной ценно-

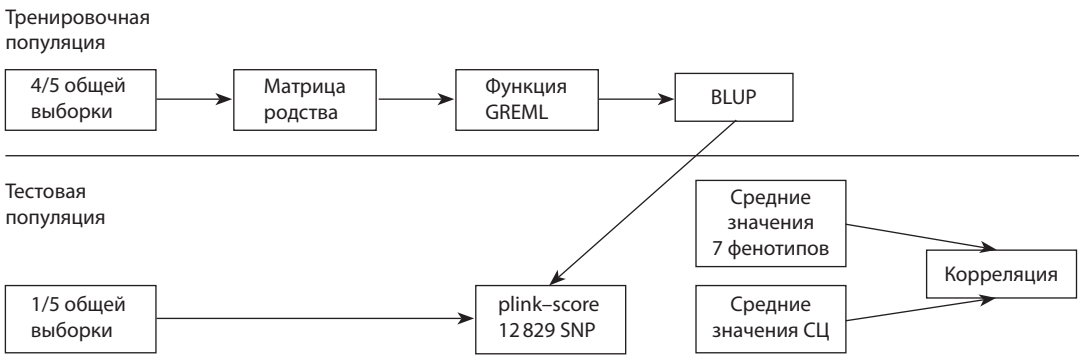


Рис. 2. Схема анализа с применением метода k-блочной кросс-валидации.

сти по содержанию элементов в пшенице с применением метода BLUP, имплементированного в программное обеспечение GCTA.

Для полученных коэффициентов была оценена селекционная ценность для всех образцов из тестовой популяции с помощью программного обеспечения plink (версия 1.90b6.26) (Purcell et al., 2007). Полученные значения были использованы для оценки качества предсказания путем подсчета коэффициентов корреляции между оцененной селекционной ценностью и реальными данными фенотипов. Также были оценены доверительные интервалы для полученных значений коэффициентов корреляции с помощью z-преобразования распределения Фишера.

Для визуализации полученных результатов были построены диаграммы рассеяния с использованием языка программирования R (версия 2022.07.0, сборка 548). Регрессионная прямая была построена с помощью формулы СЦ ~ фенотип, где СЦ – оцененная селекционная ценность, фенотип – реальные значения фенотипов.

Результаты

В табл. 1 и 2 приведены значения средних показателей содержания каждого из элементов и наследуемость признаков в 2018 и 2019 гг. соответственно. График корреляций между средними значениями фенотипа представлен на рис. 3.

Данные об оценках селекционной ценности и средних значениях содержания семи элементов для каждого сорта представлены в Приложении 1[1].

Данные об оцененных коэффициентах корреляции и доверительных интервалах, а также *p*-value между оцененной селекционной ценностью и реальными данными фенотипов для всех семи изученных элементов приведены в Приложении 2.

Были получены средние значения коэффициентов корреляции Пирсона для предсказания концентрации микроэлементов с реальными фенотипами: K – 0.67, Ca – 0.61, Mg – 0.4, Mn – 0.5, Fe – 0.38, Zn – 0.46, Cu – 0.48. Максимальный коэффициент корреляции был равен 0.75 (*p*-value = 1.85e-07) и получен для модели 4 у калия, минимальный, 0.22, – для модели 5 у железа (*p*-value = 0.24).

Сделано допущение, что предсказание селекционной ценности для элемента является значимым, если хотя бы для одной из пяти моделей *p*-value ниже порога с поправкой на множественное тестирование (*p*-value < 0.001), а для остальных четырех моделей *p*-value ниже номинального уровня значимости (*p*-value < 0.05). Таким образом, мы получили значимые оценки селекционной ценности для кальция, калия и марганца.

Абсолютные значения коэффициента корреляции для других четырех микро- и макроэлементов (Fe, Mg, Zn, Cu) и моделей входили в оцененные доверительные интервалы каждой из моделей для каждого из изученных элементов, а также достоверно отличались от нуля для 28 из 35 оцененных моделей. Для железа в трех из пяти моделей (модели под номерами 1, 4, 5) значения *p*-value были выше номинального уровня значимости 0.05. Также незначимые по уровню *p*-value значения коэффициента корреляции были получены для модели 3 у меди, модели 2 у магния, модели 4 у марганца и модели 1 у цинка. Полученные диаграммы рассеяния представлены в Приложениях 3–9.

Таблица 1. Значения средних показателей фенотипов отдельно по годам (2018 и 2019) и среднее между годами (в скобках указана стандартная ошибка)

Элемент	Среднее содержание элемента, мг/кг		
	2018 г.	2019 г.	2018 и 2019 гг.
Ca	772.67 (18.03)	666.68 (17.53)	719.67 (12.74)
Cu	3.58 (0.06)	4.41 (0.05)	3.99 (0.04)
Fe	43.17 (0.47)	46.61 (0.45)	44.89 (0.33)
K	4025.70 (37.10)	4186.73 (48.39)	4106.21 (30.63)
Mg	1588.54 (11.44)	1329.75 (11.59)	1459.14 (9.64)
Mn	37.83 (0.31)	39.05 (0.46)	38.44 (0.28)
Zn	35.89 (0.40)	46.27 (0.64)	41.08 (0.43)

Таблица 2. Наследуемость признаков по годам (в долях от единицы, где ноль – отсутствие генетического вклада в признак, единица – полностью генетически обусловленный признак) и для среднего между годами (в скобках указана стандартная ошибка)

Элемент	Наследуемость содержания элемента		
	2018 г.	2019 г.	2018 и 2019 гг.
Ca	0.66 (0.05)	0.53 (0.06)	0.70 (0.04)
Cu	0.79 (0.04)	0.82 (0.03)	0.81 (0.03)
Fe	0.89 (0.02)	0.75 (0.04)	0.84 (0.03)
K	0.72 (0.05)	0.83 (0.03)	0.89 (0.02)
Mg	0.73 (0.05)	0.55(0.06)	0.72 (0.04)
Mn	0.85 (0.03)	0.76 (0.04)	0.83 (0.03)
Zn	0.82 (0.03)	0.67(0.05)	0.73 (0.04)

Для 30 сортов с наивысшим значением оцененной селекционной ценности был оценен ответ на отбор (сравнение со средними значениями СЦ по популяции) (табл. 3). Сравнение было проведено для 30 сортов с наивысшими значениями содержания микро- и макроэлементов. Ответ на отбор для фенотипов был скорректирован на наследуемость. Только для кальция ответ на отбор, полученный с учетом СЦ, превосходил ответ на отбор, полученный для фенотипов, с учетом наследуемости (см. табл. 3). Ответ на отбор был оценен как (Ptop – Pmean)*h^2, где Ptop – среднее значение фенотипа для 30 сортов с наивысшим значением оцененной СЦ; Pmean – среднее значение фенотипа в исследуемой популяции; h^2 – показатель наследуемости данного фенотипа.

Полученные оценки селекционной ценности российских сортов пшеницы в виде коэффициентов для ОНП

[1] Приложения 1–10 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx17.pdf

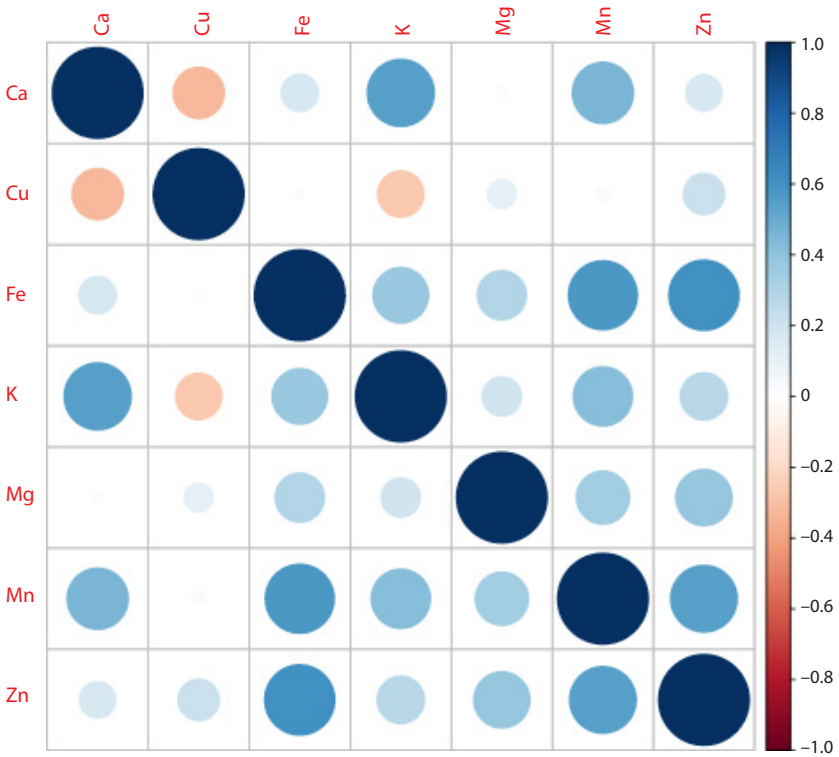


Рис. 3. График корреляций между фенотипами для 149 сортов.
Для каждого сорта значение фенотипа было вычислено как среднее между четырьмя точками.

Таблица 3. Ожидаемый ответ на отбор при использовании в качестве родительской популяции 30 сортов с наивысшей оцененной СЦ и 30 сортов с наивысшим содержанием микро- и макроэлементов

Элемент	Ответ на отбор	
	для СЦ	для фенотипов (с учетом наследуемости)
Ca	296.43	262.24
Cu	0.60	0.90
Fe	4.99	7.25
K	785.11	873.41
Mg	88.57	131.66
Mn	4.87	5.95
Zn	6.79	7.54

были зарегистрированы в едином реестре российских программ для электронных вычислительных машин и баз данных и доступны по запросу к правообладателю (Институт цитологии и генетики СО РАН) (Приложение 10).

Обсуждение

В данной работе проведено исследование несмещенных оценок эффектов генетических полиморфизмов и их использования для оценки геномного потенциала российских образцов яровой мягкой пшеницы по содержанию семи микро- и макроэлементов – K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu. Для анализа был выбран лучший несмещенный линейный прогноз (BLUP), для проверки качества модели применили подход с разделением выборки на несколько частей (k-fold cross-validation). Выбор модели и метода был обусловлен широким распространением и применением данных подходов в геномной селекции растений и животных (Piepho et al., 2008; Molenaar et al., 2018; Tajalifar, Rasooli, 2022).

Выборка была разделена на пять подвыборок случайным образом. Чтобы определить качество полученных коэффициентов ОНП для оценки селекционной ценности, была использована корреляция. Минимальное значение коэффициента корреляции было равно 0.22 для модели 5 для содержания железа (p-value = 0.24). В то же время значение p-value модели 5 для всех элементов только в одном случае из семи было выше номинального значения 0.05 для железа. Более того, из 35 полученных значений p-value для коэффициентов корреляции оцененной селекционной ценности и реальных фенотипов только 7 были равны или выше номинального уровня значимости 0.05. Это говорит об устойчивой оценке СЦ между различными частями выборки.

Следует отметить, что для кальция, калия и магния хотя бы для одной из пяти моделей коэффициент корреляции был значим с использованием порога с учетом поправки на множественное тестирование (p-value < 0.001), а остальные модели были значимы с использованием номинального уровня значимости (p-value < 0.05). Исходя из этого, мы установили, что оценки селекционной ценности для этих трех элементов значимы. Отсутствие значимости по заданному критерию для остальных четырех элементов может наблюдаться из-за множества факторов, таких как малый размер выборки, неоднородность выбранной популяции по оцененной СЦ и т. д. Были оценены доверительные интервалы для каждого полученного значения коэффициента корреляции. Для каждого из семи изученных элементов все полученные значения коэффициента корреляции для всех моделей входили в оцененные доверительные интервалы.

Одним из преимуществ использования геномной селекции, в частности с помощью BLUP, является возможность оценки ожидаемого прироста признака в следующем поколении (ответ на отбор). Нами были оценены селекционные дифференциалы и ответ на отбор для 30 сортов с наивысшим значением СЦ и 30 сортов с наивысшим значением содержания микро- и макроэлементов в пшенице. Логично, что при отборе по СЦ

ожидаемый ответ на отбор сопоставим с ожидаемым ответом на отбор по фенотипам (с учетом того, что ответ на отбор по фенотипам взвешен на наследуемость признака согласно уравнению селекционера), а в случае кальция превышает его. Полученные высокие значения селекционного дифференциала для отбора по фенотипам могут быть связаны с высокой наследуемостью и неоднородностью распределения фенотипов в исследуемой популяции.

Ранее нами был проведен полногеномный поиск ассоциаций для семи микро- и макроэлементов у сортов и интрогрессивных линий мягкой пшеницы (Potapova et al., 2023), который выявил четыре значимых локуса. Один из них был ассоциирован с содержанием калия и кальция, два – с содержанием железа и марганца и один – со всеми изученными элементами. Полученные в нашей работе результаты демонстрируют, что, действительно, с использованием данных образцов пшеницы можно получить оцененные значения селекционной ценности для предсказания содержания кальция и калия (для кальция и калия все полученные значения *p*-value были меньше номинально значимого порога 0.05). Однако для трех моделей из пяти для железа и одной модели из пяти для марганца значения *p*-value превышали номинально значимый порог. Это может быть связано как с ограниченным размером выборки, так и со многими другими факторами, например со сложной генетической структурой признака (в частности, полигенность или плейотропия), недостатком данных для предсказания (число сортов или ОНП) и др. На сегодняшний день научные публикации, в которых проводился бы анализ селекционной ценности сортов на содержание изученных нами элементов, отсутствуют, поэтому проведение сравнительного анализа не представляется возможным.

Главным ограничением настоящей работы является относительно малый размер выборки. На данный момент не существует достоверных оценок, какой минимальный размер выборки необходим для создания моделей геномной селекции. В рамках этой статьи мы эмпирически показали, что имеет смысл проводить подобные работы в случае наличия даже таких небольших выборок (149 сортов с четырьмя измерениями для каждого, всего 596 фенотипических точек). Ожидается, что при увеличении размера выборки качество моделей будет только увеличиваться. Второе ограничение нашей работы – это использование данных генотипирования микрочипов для построения моделей. Если тестовые данные генотипирования получены с помощью другого чипа или технологии, использованная нами модель будет, скорее всего, неприменима из-за низкого перекрывания по полиморфизмам. Использование методов генетической импутации может потенциально решить эту проблему и увеличить покрытие генотипирования (Nyine et al., 2019; Song et al., 2019; Munyengwa et al., 2021; Bonnett et al., 2022; Kriaridou et al., 2023). Апробация этих методов на пшенице является задачей будущих работ в данном направлении.

Заключение

Таким образом, для российских сортов пшеницы получены оценки селекционной ценности относительно содержания в зерне семи химических элементов: K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu. Результаты могут представлять интерес прежде всего для селекционеров при проведении работ по отбору и селекции сортов с повышенным содержанием микро- и макроэлементов в зерне. С помощью полученных значений оцененной селекционной ценности становится возможным ранжировать и отбирать лучшие образцы из исследуемых популяций. Эта работа может быть методологически полезна при создании моделей для проведения геномной селекции других сельскохозяйственных растений. Оценки можно использовать на практике при разработке схем селекции и непосредственно селекции новых сортов.

Список литературы / References

Жуманов К.Ж., Карымсаков Т.Н., Кинеев М.А., Баймуканов А.Д. Разработка и оптимизация уравнений смешанной модели BLUP для оценки племенной ценности быков-производителей голштинской черно-пестрой породы Республики Казахстан. *Аграр. наука.* 2021;2:33-36. DOI 10.32634/0869-8155-2021-345-2-33-36
[Zhumanov K.Z., Karymsakov T.N., Kineev M.A., Baimukanov A.D. Development and optimization of the equations of the mixed BLUP model for the evaluation of the breed value of bulls-producers of the golstin black-motioned breed of the Republic of Kazakhstan. *Agrarnaya Nauka = Agrarian Science.* 2021;2:33-36. DOI 10.32634/0869-8155-2021-345-2-33-36 (in Russian)]

Кузнецов В.М. Наилучший линейный несмещенный прогноз племенной ценности петухов по качеству потомства. *Вестн. Рос. акад. с.-х. наук.* 1999;2:61-63
[Kuznetsov V.M. The best linear unbiased forecast of the breeding value of roosters by the quality of offspring. *Vestnik Rossiiskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk = Vestnik of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 1999;2:61-63 (in Russian)]

Столповский Ю.А., Пискунов А.К., Свищева Г.Р. Геномная селекция. I. Последние тенденции и возможные пути развития. *Генетика.* 2020;56(9):1006-1017. DOI 10.31857/S0016675820090143
[Stolpovsky Y.A., Piskunov A.K., Svishcheva G.R. Genomic selection. I. Latest trends and possible ways of development. *Russ. J. Genet.* 2020;56(9):1044-1054. DOI 10.1134/S1022795420090148]

Суслина Е.Н., Новиков А.А., Павлова С.В., Башмакова Н.В., Федин Г.И., Алексеева С.И. Оценка племенной ценности свиней с использованием метода BLUP. *Изв. Тимирязев. с.-х. академии.* 2019;6:150-161. DOI 10.34677/0021-342x-2019-6-150-161
[Suslina Ye.N., Novikov A.A., Pavlova S.V., Bashmakova N.V., Fedin G.I., Alekseyeva S.I. Evaluation of breeding qualities of hog producers using the BLUP method. *Izvestiya Timiryazevskoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2019;6:150-161. DOI 10.34677/0021-342x-2019-6-150-161 (in Russian)]

Bartholomé J., Prakash P.T., Cobb J.N. Genomic prediction: progress and perspectives for rice improvement. In: Ahmadi N., Bartholomé J. (Eds.). Genomic Prediction of Complex Traits. Methods in Molecular Biology. V. 2467. New York: Humana, 2022;569-617. DOI 10.1007/978-1-0716-2205-6_21

Berkner M.O., Schulthess A.W., Zhao Y., Jiang Y., Oppermann M., Reif J.C. Choosing the right tool: Leveraging of plant genetic resources in wheat (*Triticum aestivum* L.) benefits from selection of a suitable genomic prediction model. *Theor. Appl. Genet.* 2022; 135(12):4391-4407. DOI 10.1007/s00122-022-04227-4

Bhat J.A., Ali S., Salgotra R.K., Mir Z.A., Dutta S., Jadon V., Tyagi A., Mushtaq M., Jain N., Singh P.K., Singh G.P., Prabhu K.V. Genomic selection in the era of next generation sequencing for complex traits in plant breeding. *Front. Genet.* 2016;7:221. DOI 10.3389/fgene.2016.00221

Bonnett D., Li Y., Crossa J., Dreisigacker S., Basnet B., Pérez-Rodríguez P., Alvarado G., Jannink J.L., Poland J., Sorrells M. Response to early generation genomic selection for yield in wheat. *Front. Plant Sci.* 2022;12:718611. DOI 10.3389/fpls.2021.718611

Charmet G., Storlie E. Implementation of genome-wide selection in wheat. *Russ. J. Genet. Appl. Res*. 2012;2(4):298-303. DOI 10.1134/S207905971204003X

Hoffstetter A., Cabrera A., Huang M., Sneller C. Optimizing training population data and validation of genomic selection for economic traits in soft winter wheat. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(9):2919-2928. DOI 10.1534/g3.116.032532

Johnsson M. Genomics in animal breeding from the perspectives of matrices and molecules. *Hereditas.* 2023;160(1):20. DOI 10.1186/s41065-023-00285-w

Juliana P., He X., Marza F., Islam R., Anwar B., Poland J., Shrestha S., Singh G.P., Chawade A., Joshi A.K., Singh R.P., Singh P.K. Genomic selection for wheat blast in a diversity panel, breeding panel and full-sibs panel. *Front. Plant Sci.* 2022;12:745379. DOI 10.3389/fpls.2021.745379

Kriaridou C., Tsairidou S., Fraslin C., Gorjanc G., Looseley M.E., Johnston I.A., Houston R.D., Robledo D. Evaluation of low-density SNP panels and imputation for cost-effective genomic selection in four aquaculture species. *Front. Genet.* 2023;14:1194266. DOI 10.3389/fgene.2023.1194266

Leonova I.N., Skolotneva E.S., Orlova E.A., Orlovskaya O.A., Salina E.A. Detection of genomic regions associated with resistance to stem rust in Russian spring wheat varieties and breeding germplasm. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(13):4706. DOI 10.3390/ijms21134706

Liu J., Wu B., Singh R.P., Velu G. QTL mapping for micronutrients concentration and yield component traits in a hexaploid wheat mapping population. *J. Cereal Sci.* 2019;88:57-64. DOI 10.1016/j.jcs.2019.05.008

Lopez-Cruz M., Olson E., Rovere G., Crossa J., Dreisigacker S., Mondal S., Singh R., Campos G.L. Regularized selection indices for breeding value prediction using hyper-spectral image data. *Sci. Rep.* 2020;10(1):8195. DOI 10.1038/s41598-020-65011-2

Lozada D.N., Carter A.H. Genomic selection in winter wheat breeding using a recommender approach. *Genes.* 2020;11(7):779. DOI 10.3390/genes11070779

Martini J.W.R., Gao N., Cardoso D.F., Wimmer V., Erbe M., Cantet R.J., Simianer H. Genomic prediction with epistasis models: on the marker-coding-dependent performance of the extended GBLUP and properties of the categorical epistasis model (CE). *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):3. DOI 10.1186/s12859-016-1439-1

Melucci L.M., Birchmeier A.N., Cappa E.P., Cantet R.J. Bayesian analysis of selection for greater weaning weight while maintaining birth weight in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2009;87(10):3089-3096. DOI 10.2527/jas.2009-1801

Miller M.J., Song Q., Fallen B., Li Z. Genomic prediction of optimal cross combinations to accelerate genetic improvement of soybean (*Glycine max*). *Front. Plant Sci.* 2023;14:1171135. DOI 10.3389/fpls.2023.1171135

Molenaar H., Boehm R., Piepho H.-P. Phenotypic selection in ornamental breeding: It's better to have the BLUPs than to have the BLUEs. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1511. DOI 10.3389/fpls.2018.01511

Munyengwa N., Le Guen V., Bille H.N., Souza L.M., Clément-Demange A., Mournet P., Masson A., Soumahoro M., Kouassi D., Cros D. Optimizing imputation of marker data from genotyping-by-sequencing (GBS) for genomic selection in non-model species: Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) as a case study. *Genomics.* 2021;113(2):655-668. DOI 10.1016/j.ygeno.2021.01.012

Nyine M., Wang S., Kiani K., Jordan K., Liu S., Byrne P., Haley S., Baenziger S., Chao S., Bowden R., Akhunov E. Genotype imputation in winter wheat using first-generation haplotype map SNPs improves genome-wide association mapping and genomic prediction of traits. *G3 (Bethesda).* 2019;9(1):125-133. DOI 10.1534/g3.118.200664

Piepho H.P., Möhring J., Melchinger A.E., Büchse A. BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica.* 2008;161:209-228. DOI 10.1007/s10681-007-9449-8

Plavšin I., Gunjača J., Galić V., Novoselović D. Evaluation of genomic selection methods for wheat quality traits in biparental populations indicates inclination towards parsimonious solutions. *Agronomy.* 2022;12(5):1126. DOI 10.3390/agronomy12051126

Potapova N.A., Timoshchuk A.N., Tiys E.S., Vinichenko N.A., Leonova I.N., Salina E.A., Tsepilov Y.A. Multivariate genome-wide association study of concentrations of seven elements in seeds reveals four new loci in Russian wheat lines. *Plants.* 2023;12(17):3019. DOI 10.3390/plants12173019

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

Rabieyan E., Bihamta M.R., Moghaddam M.E., Mohammadi V., Alipour H. Genome-wide association mapping and genomic prediction of agronomical traits and breeding values in Iranian wheat under rain-fed and well-watered conditions. *BMC Genomics.* 2022;23(1):831. DOI 10.1186/s12864-022-08968-w

Sandhu K.S., Lozada D.N., Zhang Z., Pumphrey M.O., Carter A.H. Deep learning for predicting complex traits in spring wheat breeding program. *Front. Plant Sci.* 2021a;11:613325. DOI 10.3389/fpls.2020.613325

Sandhu K., Patil S.S., Pumphrey M., Carter A. Multitrait machine- and deep-learning models for genomic selection using spectral information in a wheat breeding program. *Plant Genome.* 2021b;14(3):e20119. DOI 10.1002/tpg2.20119

Sirsat M.S., Oblessuc P.R., Ramiro R.S. Genomic prediction of wheat grain yield using machine learning. *Agriculture.* 2022;12(9):1406. DOI 10.3390/agriculture12091406

Song H., Ye S., Jiang Y., Zhang Z., Zhang Q., Ding X. Using imputation-based whole-genome sequencing data to improve the accuracy of genomic prediction for combined populations in pigs. *Genet. Sel. Evol.* 2019;51(1):58. DOI 10.1186/s12711-019-0500-8

Tajalifar M., Rasooli M. Importance of BLUP method in plant breeding. *J. Plant Sci. Phytopathol.* 2022;6(2):40-42. DOI 10.29328/journal.jpsp.1001072

Tsai H.Y., Janss L.L., Andersen J.R., Orabi J., Jensen J.D., Jahoor A., Jensen J. Genomic prediction and GWAS of yield, quality and disease-related traits in spring barley and winter wheat. *Sci. Rep.* 2020;10(1):3347. DOI 10.1038/s41598-020-60203-2

Wang X., Xu Y., Hu Z., Xu C. Genomic selection methods for crop improvement: Current status and prospects. *Crop J.* 2018;6(4):330-340. DOI 10.1016/j.cj.2018.03.001

Yang J., Lee S.H., Goddard M.E., Visscher P.M. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;88(1):76-82. DOI 10.1016/j.ajhg.2010.11.011

Zhao Y., Mette M.F., Gowda M., Longin C.F., Reif J.C. Bridging the gap between marker-assisted and genomic selection of heading time and plant height in hybrid wheat. *Heredity.* 2014;112(6):638-645. DOI 10.1038/hdy.2014.1

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.11.2023. После доработки 06.03.2024. Принята к публикации 12.03.2024.

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 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.
Дата публикации 28.06.2024. Формат 60 × 84 $^{1}/_{8}$. Уч.-изд. л. 13.9.