

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2024 • 28 • 7

Молекулярная и клеточная биология / Генетика и селекция растений /
Генетика животных / Медицинская генетика



Глубокоуважаемые коллеги!
Мы рады сообщить, что с 05 по 10 октября 2025 года состоится
Третий международный конгресс “CRISPR-2025”!

На этот раз организаторы конгресса встретят участников в гостеприимном солнечном Ереване (Армения).

Это событие станет площадкой для экспертного обсуждения последних достижений, вызовов и этических аспектов, связанных с использованием широчайшего спектра технологических подходов, направленных на редактирование геномов.

Организаторы:

- Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия),
- Институт химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск, Россия),
- Российско-армянский университет (Ереван, Армения),
- Институт молекулярной биологии НАН РА (Ереван, Армения)
- Сургутский государственный университет (Сургут, Россия).

Партнеры: BIOCAD, Фонд научно-технологического развития Югры.

Предыдущие конгрессы, проведённые в 2018-м и 2023-м годах в Новосибирске, продемонстрировали востребованность и актуальность формата мероприятия.

Стремительно совершенствующиеся методы геномного редактирования, в том числе в области клинического применения CRISPR-систем, требуют всестороннего осмысления с учётом различных областей знаний.

Именно поэтому по сложившейся традиции мы предлагаем широкий спектр направлений, которые будут обсуждаться на конгрессе “CRISPR-2025”:

- Cell Technologies
- Regenerative Medicine
- Intelligent Data Science
- Synthetic Biology
- Postgenome
- Research & Development.

Традиционно участники конгресса представят передовые разработки и фундаментальные исследования в области CRISPR, их применение в медицине, сельском хозяйстве, эволюционной и палеобиологии.

Предстоящий конгресс станет пространством для взаимодействия учёных, врачей и представителей индустрии, обмена идеями и эффективного сотрудничества.

В программе

- пленарные и секционные выступления,
- конкурс молодых учёных,
- конкурс постерных докладов,
- панельная дискуссия «От предсказания лекарств с помощью искусственного интеллекта, точного редактирования генома до клеточной и генной терапии».

Для всех желающих познакомиться с армянскими традициями оргкомитет готовит интересную культурную программу.

Приглашаем постоянных и новых участников: учёных, врачей, студентов и представителей бизнеса.

Информационный сайт конгресса: <https://crispr2025.rau.am/>



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-24-75

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, проф. (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. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

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

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

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

Online edition

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/vjgb-24-75

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

N.E. Gruntenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

A.M. Kudryavtsev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.M. Larkin, Cand. Sci. (Biology), Great Britain

I.N. Lavrik, Dr. Sci. (Biology), Germany

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.R. Mursalimov, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.Yu. Novikova, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

E.K. Potokina, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

E.Y. Rykova, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Y.N. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia

R.I. Sheiko, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Agricul.), Belarus

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Vasiliev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Молекулярная и клеточная биология

- 679 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MART*. Е.В. Григорьева, А.А. Малахова, Е.С. Яркова, Ю.М. Минина, Ю.В. Вяткин, Ю.А. Надточий, Е.А. Хабарова, Дж.А. Рзаев, С.П. Медведев, С.М. Закиян
- 688 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Сравнительный анализ первичной структуры и получение рекомбинантной поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 долгоживущего *Heterocephalus glaber*. К.Н. Науменко, А.Р. Нурисламов, К.Д. Назаров, В.С. Фишман, А.А. Попов, И.О. Петрусева, А.Н. Евдокимов, О.И. Лаврик
- 696 **ОБЗОР**
Концепция природной реконструкции генома. Часть 1. Основные положения концепции природной реконструкции генома. Изменение генома гемопоэтических стволовых клеток с использованием нескольких природных клеточных механизмов, имманентно присущих гемопоэтической стволовой клетке и определяющих ее биологический статус как «источник репаративного потенциала организма». Л.А. Якубов, О.С. Таранов, С.В. Сидоров, С.Д. Никонов, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, С.С. Богачев

Генетика и селекция растений

- 706 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика *Micractinium thermotolerans* и *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) из пирокластических отложений полуострова Камчатка (Россия). Р.З. Суценко, В.Ю. Никулин, В.Б. Багмет, А.Ю. Никулин
- 716 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Цитогенетические особенности межродовых амфидиплоидов и геномно-замещенных форм пшеницы. Е.Д. Бадаева, Р.О. Давоян, Н.А. Терещенко, Е.В. Лялина, С.А. Зошук, Н.П. Гончаров
- 731 **ОБЗОР**
Потенциал коллекции амаранта ВИР в свете мировых тенденций использования и селекции. Д.В. Соколова, А.Е. Соловьева, А.М. Зарецкий, Т.В. Шеленга

Генетика животных

- 744 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изменения в черной субстанции головного мозга у мышей, моделирующих болезнь Паркинсона. И.Н. Рожкова, С.В. Окотруб, Е.Ю. Брусенцев, Т.А. Рахманова, Д.А. Лебедева, В.С. Козенева, Н.А. Шавшаева, Н.В. Хоцкин, С.Я. Амстиславский
- 752 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Пространственная генетическая характеристика красной лисицы (*Vulpes vulpes*) в районе между Альпами и центральными Динарскими горами. А. Деведжич, Ф. Урзи, Б. Покорны, Г. Венгушт, Д.Ж. Венгушт, Ф. Янжекович, Л. Велич, Т. Этерович, Б.К. Стройл, Э. Бужан (на англ. языке)
- 759 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Комплексный цитогенетический анализ кариотипов трех видов уток (шилохвость, кряква и обыкновенный гоголь) и эволюция кариотипов у представителей семейства Anatidae (Anseriformes, Aves). В.Р. Беклемишева, К.В. Тишакова, С.А. Романенко, Д.А. Андреюшкова, В.А. Юдкин, Е.А. Интересова, Ф. Янг, М.А. Фергюсон-Смит, А.С. Графодатский, А.А. Проскурякова (на англ. языке)

Медицинская генетика

- 770 **ОБЗОР**
Транскрипционный фактор TCF4: структура, функции и ассоциированные заболевания. Р.Р. Савченко, Н.А. Скрыбин
- 780 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Распространенность микроделений AZFc региона Y-хромосомы и влияние на сперматогенез у российских мужчин из общей популяции. Л.В. Осадчук, Г.В. Васильев, М.К. Иванов, М.А. Прасолова, М.А. Клещев, А.В. Осадчук
- 792 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Полиморфные варианты генов ферментов антиоксидантной системы, апоптоза и воспаления как потенциальные предикторы инфаркта миокарда. Т.Р. Насибуллин, В.В. Эрдман, Я.Р. Тимашева, И.А. Туктарова, А.А. Петинцева, Г.Ф. Корытина

Molecular and cell biology

- 679 **ORIGINAL ARTICLE**
Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene. E.V. Grigor'eva, A.A. Malakhova, E.S. Yarkova, J.M. Minina, Y.V. Vyatkin, J.A. Nadtochy, E.A. Khabarova, J.A. Rzaev, S.P. Medvedev, S.M. Zakian
- 688 **ORIGINAL ARTICLE**
Comparative analysis of the primary structure and production of recombinant poly(ADP-ribose)polymerase 1 of long-lived *Heterocephalus glaber*. K.N. Naumenko, A.R. Nurislamov, K.D. Nazarov, V.S. Fishman, A.A. Popov, I.O. Petruseva, A.N. Evdokimov, O.I. Lavrik
- 696 **REVIEW**
The concept of natural genome reconstruction. Part 1. Basic provisions of the “natural genome reconstruction” concept. Changing the genome of hematopoietic stem cells using several natural cellular mechanisms that are inherent in the hematopoietic cell and determine its biological status as “the source of the body’s reparative potential”. L.A. Yakubov, O.S. Taranov, S.V. Sidorov, S.D. Nikonov, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh, N.A. Kolchanov, S.S. Bogachev

Plant genetics and breeding

- 706 **ORIGINAL ARTICLE**
Molecular genetic and morphological characteristics of *Micractinium thermotolerans* and *M. inermum* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta) from pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula (Russia). R.Z. Sushchenko, V.Yu. Nikulin, V.B. Bagmet, A.Yu. Nikulin
- 716 **ORIGINAL ARTICLE**
Cytogenetic features of intergeneric amphidiploids and genome-substituted forms of wheat. E.D. Badaeva, R.O. Davoyan, N.A. Tereshchenko, E.V. Lyalina, S.A. Zoshchuk, N.P. Goncharov
- 731 **REVIEW**
The potential of the amaranth collection maintained at VIR in the context of global plant breeding and utilization trends. D.V. Sokolova, A.E. Solovieva, A.M. Zaretsky, T.V. Shelenga

Animal genetics






- 744 **ORIGINAL ARTICLE**
Substantia nigra alterations in mice modeling Parkinson’s disease. I.N. Rozhkova, S.V. Okotrub, E.Yu. Brusentsev, T.A. Rakhmanova, D.A. Lebedeva, V.S. Kozenova, N.A. Shavshaeva, N.V. Khotskin, S.Ya. Amstislavsky
- 752 **ORIGINAL ARTICLE**
Spatial genetic characterization of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the area between the Alps and the Central Dinaric Mountains. A. Devedžić, F. Urzi, B. Pokorný, G. Vengušt, D.Ž. Vengušt, F. Janžeković, L. Velić, T. Eterović, B.K. Stroil, E. Bužan
- 759 **ORIGINAL ARTICLE**
Detailed cytogenetic analysis of three duck species (the northern pintail, mallard, and common goldeneye) and karyotype evolution in the family Anatidae (Anseriformes, Aves). V.R. Beklemisheva, K.V. Tishakova, S.A. Romanenko, D.A. Andreyushkova, V.A. Yudkin, E.A. Interesova, F. Yang, M.A. Ferguson-Smith, A.S. Graphodatsky, A.A. Proskuryakova

Medical genetics

- 770 **REVIEW**
Transcription factor TCF4: structure, function, and associated diseases. R.R. Savchenko, N.A. Skryabin
- 780 **ORIGINAL ARTICLE**
Prevalence of AZFc Y chromosome microdeletions and association with spermatogenesis in Russian men from the general population. L.V. Osadchuk, G.V. Vasiliev, M.K. Ivanov, M.A. Prasolova, M.A. Kleshchev, A.V. Osadchuk
- 792 **ORIGINAL ARTICLE**
Polymorphic variants of the genes for enzymes of the antioxidant system, apoptosis and inflammation as potential predictors of myocardial infarction. T.R. Nasibullin, V.V. Erdman, Y.R. Timasheva, I.A. Tuktarova, A.A. Petinseva, G.F. Korytina

DOI 10.18699/vjgb-24-76

Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*

Е.В. Григорьева^{1, 2} , А.А. Малахова^{1, 2} , Е.С. Яркова^{1, 3}, Ю.М. Минина¹ , Ю.В. Вяткин⁴, Ю.А. Надточий^{1, 3},
Е.А. Хабарова^{1, 5}, Дж.А. Рзаев⁵, С.П. Медведев¹ , С.М. Закиян¹ 


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

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ ООО «Новые Программные Системы», Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

 evlana@bionet.nsc.ru

Аннотация. Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17 – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся патологической агрегацией белка тау с образованием нейрофибриллярных клубков и дальнейшей гибелью нейронов. Наследственная форма лобно-височной деменции может быть вызвана мутациями в различных генах, одним из которых является ген *MAPT* на хромосоме 17, кодирующий тау-белок. Поскольку на данный момент отсутствуют утвержденные медицинским сообществом способы борьбы с лобно-височной деменцией, исследование на клеточных моделях *in vitro* молекулярно-генетических механизмов, приводящих к развитию заболевания, поиск мишеней для терапевтического воздействия и возможность тестирования потенциальных лекарственных препаратов для предотвращения гибели нейронов являются актуальной задачей. Анализ данных секвенирования экзона 46-летней пациентки с клиническим диагнозом болезнь Паркинсона показал наличие патологического варианта с.2013T>G (rs63750756) в гене *MAPT*, который ассоциирован с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17. При помощи репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациентки нами были получены десять линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), из которых детально охарактеризованы две. Репрограммирование проводили с помощью трансфекции неинтегрирующимися эписомными векторами, которые экспрессируют белки OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и trp53DD. Линии ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B стабильно пролиферируют, образуют колонии с характерной для плюрипотентных клеток человека морфологией, имеют нормальный диплоидный кариотип (46,XX), экспрессируют эндогенную щелочную фосфатазу и маркеры плюрипотентности (OCT4, NANOG, SSEA-4 и TRA-1-60) и способны дифференцироваться в производные трех зародышевых листков: энто-, экто- и мезодерму. Благодаря тому, что ИПСК можно направленно дифференцировать в широкий спектр типов клеток, полученные в данной работе и детально охарактеризованные линии ИПСК являются уникальным инструментом для изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17, а также тестирования потенциальных лекарственных препаратов *in vitro*.

Ключевые слова: лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ген *MAPT*.

Для цитирования: Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(7):679-687. DOI 10.18699/vjgb-24-76

Финансирование. Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1063/10.

Благодарности. Анализ препаратов с иммунофлуоресцентным окрашиванием и дифференциальным окрашиванием хромосом проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmtabo/>), поддержанного бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН (FWNR-2022-0015).

Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene

E.V. Grigor'eva ^{1, 2} , A.A. Malakhova ^{1, 2}, E.S. Yarkova^{1, 3}, J.M. Minina ¹, Y.V. Vyatkin⁴, J.A. Nadtochy^{1, 3}, E.A. Khabarova^{1, 5}, J.A. Rzaev⁵, S.P. Medvedev ^{1, 2}, S.M. Zakian ^{1, 2}


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

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ NOVEL Ltd., Novosibirsk, Russia

⁵ Federal Neurosurgical Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

 evlena@bionet.nsc.ru

Abstract. Frontotemporal dementia with parkinsonism-17 is a neurodegenerative disease characterised by pathological aggregation of the tau protein with the formation of neurofibrillary tangles and subsequent neuronal death. The inherited form of frontotemporal dementia can be caused by mutations in several genes, including the *MAPT* gene on chromosome 17, which encodes the tau protein. As there are currently no medically approved treatments for frontotemporal dementia, there is an urgent need for research using *in vitro* cell models to understand the molecular genetic mechanisms that lead to the development of the disease, to identify targets for therapeutic intervention and to test potential drugs to prevent neuronal death. Analysis of exome sequencing data from a 46-year-old patient with a clinical diagnosis of Parkinson's disease revealed the presence of the pathological variant c.2013T>G (rs63750756) in the *MAPT* gene, which is associated with frontotemporal dementia with parkinsonism-17. By reprogramming the patient's peripheral blood mononuclear cells, we obtained induced pluripotent stem cells (iPSCs). Two iPSC lines were characterised in detail. Reprogramming was performed by transfection with non-integrating episomal vectors expressing the OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC and mp53DD proteins. The iPSC lines ICGi052-A and ICGi052-B proliferate stably, form colonies with a morphology characteristic of human pluripotent cells, have a normal diploid karyotype (46,XX), express endogenous alkaline phosphatase and pluripotency markers (OCT4, NANOG, SSEA-4 and TRA-1-60) and are able to differentiate into derivatives of three germ layers: ento-, ecto- and mesoderm. The iPSC lines obtained and characterised in detail in this work represent a unique tool for studying the molecular genetic mechanisms of the pathogenesis of frontotemporal dementia with parkinsonism-17, as well as for testing potential drugs *in vitro*.

Key words: frontotemporal dementia with parkinsonism-17; induced pluripotent stem cells; *MAPT* gene.

For citation: Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadtochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):679-687. DOI 10.18699/vjgb-24-76

Введение

Лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17, впервые была описана Линчем и его коллегами в 1994 г. (Lynch et al., 1994). Этот наследуемый синдром деменции с ранним началом включает также паркинсонизм – комплекс симптомов, содержащий как немоторные проявления, например когнитивные нарушения, депрессии, биполярное расстройство, нарушения сна, так и моторные нарушения, такие как ригидность мышц, тремор в покое, брадикинезия. Ранние психические расстройства и изменения личности часто предшествуют выраженной деменции.

Ген *MAPT* кодирует белок тау, который регулирует сборку и стабилизацию микротрубочек, участвуя в передаче сигнала в центральной нервной системе и аксональном транспорте (Esmaeli-Azad et al., 1994). В мозге человека экспрессируются шесть изоформ тау-белка, благодаря альтернативному сплайсингу экзонов 2, 3 и 10 мРНК гена *MAPT*. Альтернативный сплайсинг экзона 10 приводит к

образованию тау-белка с тремя (3R) или четырьмя (4R) белковыми доменами, связывающими микротрубочки (MT-связывающие). Изоформы 4R тау демонстрируют повышенное сродство к микротрубочкам по сравнению с изоформами 3R. В детском возрасте в мозге преобладает форма 3R, в мозге взрослого человека формы 3R и 4R находятся в соотношении 1:1 (D'Souza, Schellenberg, 2006).

Генетический вариант *MAPT*:c.2013T>G (rs63750756, p.N279K) является миссенс-мутацией в экзоне 10 (Hasegawa et al., 1999), приводящей к замене аспарагина на лизин в позиции 279 белка *MAPT*. Вследствие этой замены происходит усиление полипуриново-положительного цис-элемента, присутствующего в 10-м экзоне, что увеличивает частоту включения экзона 10 в транскрипт во время сплайсинга (Ritter et al., 2018). В результате меняется соотношение форм 3R и 4R, что дестабилизирует микротрубочки, нарушает субклеточный транспорт везикул (Wren et al., 2015), вызывает образование нитевидных включений (Ghetti et al., 2015) и последующую гибель ней-

ронов. Кроме того, нейроны с данным генетическим вариантом характеризуются повышенными спонтанными колебаниями кальция, митохондриальной дисфункцией и повышенной продукцией активных форм кислорода, что также приводит к гибели клеток (Korn et al., 2023).

Вышеперечисленные процессы вызывают развитие лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17. Точный механизм развития болезни при этом генетическом варианте пока неизвестен, что не позволяет выработать схему лечения.

Для изучения развития лобно-височной деменции применяются различные модели. Прежде всего, это модели на животных, преимущественно на грызунах: лабораторных мышах и крысах. Грызунов активно используют для создания моделей нейродегенеративных заболеваний (Britti et al., 2020; Esteras et al., 2021). Также существуют трансгенные линии лабораторных животных, несущих генетические варианты, которые вызывают наследственную лобно-височную деменцию (Dawson et al., 2007). Однако эти модельные системы имеют некоторые ограничения, обусловленные различиями в признаках старения между мышами и людьми и даже различиями между tau-белком мыши и человека (Iovino et al., 2015; Hernández et al., 2020). Поэтому на сегодняшний день помимо животных моделей наиболее перспективными считаются модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – это клетки, полученные с помощью репрограммирования соматических клеток и характеризующиеся способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков подобно эмбриональным стволовым клеткам. ИПСК обладают всеми свойствами эмбриональных стволовых клеток и при этом являются аутологичными по отношению к донору соматических клеток (Valetdinova et al., 2021). Такие клетки обладают большим потенциалом для персонализированной медицины, поскольку их можно получить в любой период жизни пациента и они будут пациент-специфичными. ИПСК позволяют обойти иммуногенные и этические проблемы, поэтому их востребованность растет. Теоретически ИПСК можно получить с помощью репрограммирования любого зрелого типа клеток, выделенного из организма. Для этого используют фибробласты, мононуклеарные клетки крови, кератиноциты, а также меланоциты.

Поскольку ИПСК могут быть дифференцированы в любой тип клеток, спектр их применения очень широк (Liu et al., 2020). Дифференцированные производные ИПСК, например нейрон-подобные клетки, можно применять для исследования молекулярно-генетических механизмов развития патологии, в том числе на ранних стадиях дифференцировки клеток, проводить поиск молекул-мишеней, а также тестировать различные химические соединения, являющиеся потенциальными лекарственными препаратами (Grigor'eva et al., 2023).

В настоящей работе нами были получены, охарактеризованы и паспортизованы две линии ИПСК пациента с патологическим генетическим вариантом *МАРТ:с.2013Т>G* (rs63750756, p.N279K), приводящим к развитию лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17. Полученные

линии ИПСК являются клеточной моделью для изучения механизмов развития данного заболевания, а также могут быть использованы для скрининга потенциальных лекарственных препаратов.

Материалы и методы

Соблюдение этических норм. Исследование одобрено Комитетом по этике научных исследований Федерального центра нейрохирургии (Новосибирск, Россия), протокол № 1 от 14 марта 2017 г. Образцы периферической крови пациентки были предоставлены Федеральным центром нейрохирургии (Новосибирск, Россия). Пациентка подписала информированное добровольное согласие и информационный лист.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови в градиенте фикола. Забор периферической крови осуществлялся в два вакутейнера (вакуумные пробирки VACUETTE с K3EDTA, Greiner Bio) объемом 9 мл. Для выделения мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови насливали 3–4 мл крови на 3–4 мл раствора фикола (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich или Биолот, плотность 1.077) и центрифугировали на центрифуге с медленным раскручиванием и остановкой ротора (SL 16 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific) при 400g 35–40 мин. Далее аккуратно собирали белесый ободок интерфазы, содержащий МНК, переносили в 15 мл пробирку и промывали дважды в максимальном объеме PBS с центрифугированием при 300g в течение 15–20 мин. МНК замораживали в среде, содержащей 90 % заменителя сыворотки KnockOut (Thermo Fisher Scientific) и 10 % ДМСО (Sigma-Aldrich), по 5–10 миллионов клеток на криопробирку.

Репрограммирование пациент-специфичных МНК и условия культивирования полученных ИПСК. Трансфекцию МНК проводили на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) с использованием эпсомных векторов (OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, mp53DD и EBNA1) (Addgene ID No. 41813–14, 41855–57), как описано ранее (Grigor'eva et al., 2023). Для трансфекции 1×10^6 МНК брали по 0.5 мкг каждого из векторов, использовали программу: 1650 В, 10 мс, 3 импульса. Клетки сажали на обработанный митомицином С (Sigma-Aldrich) слой эмбриональных фибробластов (фидер). Индивидуальные колонии клеток пересаживали микрокапилляром в лунки 48-ячеечного планшета с заранее посаженным фидером и культивировали в среде для ИПСК DMEM/F12, содержащей 15 % KnockOut Serum Replacement, 1 % GlutaMAX-I, 0.1 mM NEAA, 1 % пенициллин-стрептомицин (все Thermo Fisher Scientific), 0.1 mM 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich) и 10 нг/мл bFGF (SCI Store). Колонии клеток пересаживали ферментативно с использованием TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) один раз в 4–5 дней в соотношении 1:8–1:10 с добавлением на сутки 2 мкг/мл ROCK ингибитора Thiazovivin (Sigma-Aldrich). Все клетки культивировали во влажной камере CO₂-инкубатора при 37 °C и 5 % CO₂.

Выявление эндогенной щелочной фосфатазы. Клетки фиксировали высушиванием на воздухе и окрашивали с использованием реагента SIGMAFAST BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) по протоколу производителя 10–15 мин

Таблица 1. Антитела, используемые в работе

Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности			
Rabbit IgG anti-OCT4	1:200	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
Rabbit IgG anti-NANOG		Abcam, ab62734	RRID:AB_956161
Mouse IgG3 anti-SSEA-4		Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
Mouse IgM anti-TRA-1-60		Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных			
Mouse IgG2a anti-αSMA	1:200	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
Mouse IgG1 anti-CD29 (Integrin beta 1) (TS2/16)	1:100	Thermo Fisher Scientific, 14-0299-82	RRID:AB_1210468
Chicken IgY anti-MAP2	1:1000	Abcam, ab5392	RRID:AB_2138153
Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/ Clone: TUJ1		BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18 (KRT18)	1:250	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
Mouse IgG1 anti- HNF3β/FOXA2	1:50	Santa Cruz Biotechnology, sc-374376	RRID:AB_10989742
Вторичные антитела			
Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID:AB_2535766
Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A21121	RRID:AB_2535764
Goat anti-Chicken IgY H&L, Alexa Fluor 488		Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653
Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568		Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
Goat anti-Mouse IgG2a Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A21131	RRID:AB_2535771
Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568		Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568		Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157

в темноте при комнатной температуре (КТ). Промывали PBS и визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного анализа клетки сажали на 8-ячеечные планшеты Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific), фиксировали 10 мин при КТ в 4 % параформальдегиде (ПФА, Sigma-Aldrich), пермеабилizировали 30 мин при КТ в 0.5 % Тритон-X100 (Sigma-Aldrich), инкубировали 30 мин при КТ с 1 % BCA (VWR). С первичными антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С, вторичные антитела добавляли на 1.5 ч при КТ (табл. 1). Ядра контрастировали DAPI. Микроизображения были сделаны с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements Advanced Research, версия 4.30.

Спонтанная дифференцировка ИПСК в эмбрионных тельцах. Для выявления потенциала клеток давать три зародышевых листка проводили спонтанную дифференцировку ИПСК в эмбрионных тельцах, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2023). Коротко: клетки снимали 0.15 % коллагеназой IV типа (Thermo Fisher Scientific) и сажали на чашки, покрытые 1 % агарозой, в среду для культивирования ИПСК без добавления bFGF. Через

9–14 дней эмбрионные тельца переносили на покрытые матригелем (Corning) 8-ячеечные планшеты Chambered Coverglass и культивировали еще 7–9 дней. Далее фиксировали 4 % ПФА и выполняли иммунофлуоресцентное окрашивание. Список антител представлен в табл. 1.

Карiotипирование линий ИПСК. Клетки наращивали до монослоя и рассаживали на четыре лунки 12-ячеечного планшета, покрытого белками экстраклеточного матрикса Matrigel (Corning), культивировали 48–72 ч в зависимости от скорости пролиферации клеток. За 2.5 ч до фиксации среду меняли на свежую, добавляли 3 мкг/мл бромистого этидия и 50 нг/мл коллемеида и оставляли клетки в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Затем клетки в лунках дезагрегировали 300 мкл TrypLE Express и заливали по 3 мл гипотонического раствора 0.28 % KCl на 20 мин при 37 °С, после чего добавляли 2 капли фиксатора Карнуа (3 части метанола, 1 часть ледяной уксусной кислоты); суспензию клеток аккуратно переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 7 мин при 1300 об/мин. Фиксировали клетки добавлением 1.5 мл свежего фиксатора Карнуа к осадку клеток в течение 15 мин на льду. Далее центрифугировали клетки 5 мин при 1300 об/мин, проводили две смены фиксатора Карнуа и раскапывали 70–80 мкл суспензии клеток на влажные охлажденные

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых в работе

Применение	Ген/локус	Размер продукта, п. н.	Прямой/обратный праймер (5'-3')
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (ОТ-кПЦР)	Бета-2-микроглобулин	90	TAGCTGTGCTCGGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (ОТ-кПЦР)	<i>NANOG</i>	116	TTTGTGGGCTGAAGAAACT/ AGGGCTGCTCTGAATAAGCAG
	<i>OCT4</i>	94	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	<i>SOX2</i>	100	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAATCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
Подтверждение мутации	<i>MAPT:c.2013T>G</i>	427	TCGTAAAGCCCGCTGGAAAT/ GTGTACGCACTCACCACT

предметные стекла с высоты 10–20 см. Оставляли препараты высохнуть при комнатной температуре.

Для получения дифференциальной окраски хромосом препараты окрашивали раствором DAPI (200 нг/мл, в 2хSSC) в течение 5 мин. Затем препараты споласкивали в буфере 2хSSC и в воде. После высушивания препаратов на воздухе наносили 7–10 мкл антифейда (Vector) под покровное стекло.

Анализ хромосом проводили на микроскопе Axioplan 2 (Zeiss), оснащенном CCD камерой CV-M300 (JAI Corp.), в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов в Институте цитологии и генетики СО РАН. Для обработки метафаз и раскладывания хромосом использовали программное обеспечение ISIS 5 (MetaSystems Group).

Выделение геномной ДНК и РНК. Геномную ДНК выделяли из МНК и ИПСК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) или экстракцией с применением QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Выявление патологического генетического варианта в пациент-специфичных МНК и полученных ИПСК. Секвенирование клинического экзона образцов ДНК пациентов проводили в ООО «Геноаналитика» (Москва). Геномная ДНК была фрагментирована ультразвуком на приборе Covaris S2 до среднего размера 300 нуклеотидов. После измерения концентрации 800 нг было взято для приготовления библиотек при помощи набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) согласно инструкции производителя. Далее полученная библиотека была гибридинизована с зондами, соответствующими белок-кодирующим частям генома человека, с использованием набора Sure Select AllExome V7 (Agilent) согласно инструкции. После гибридинизации библиотеку секвенировали парноконцевыми чтением длинной 150 нуклеотидов на приборе HiSeq 2500 (Illumina). Необработанные данные секвенирования экзона пациента PD57 доступны в базе данных SRA (проект PRJNA563295,

образец SAMN42050731, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bio-sample/42050731>).

Для подтверждения наличия однонуклеотидного полиморфизма выполняли секвенирование продуктов ПЦР по Сэнгеру, последовательности праймеров приведены в табл. 2. ПЦР проводили на термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2х) (ООО «Биолабмикс») и следующей программы: 95 °С – 3 мин; 35 циклов: 95 °С – 30 с, 68 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; и 72 °С – 5 мин. Продукты ПЦР очищали с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением с применением набора Cleanup mini («Евроген») по протоколу производителя. Реакции секвенирования по Сэнгеру осуществляли с помощью Big Dye Terminator V. 3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на генетическом анализаторе ABI 3130XL в ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности. Обратную транскрипцию РНК проводили с помощью ревертазы М-MuLV («Биолабмикс»). Количественную ПЦР выполняли на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с набором БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 2х («Биолабмикс») с использованием программы: 95 °С – 5 мин; 40 циклов: 95 °С – 10 с, 60 °С – 1 мин. Последовательности праймеров на гены плюрипотентности представлены в табл. 2. Значения СТ нормализовали к бета-2-микроглобулину с использованием ΔΔСТ-метода.

ПЦР анализ для выявления эписом и микоплазмы. Детектировали контаминацию микоплазмой и наличие последовательностей эписом в клетках с помощью ПЦР (95 °С – 5 мин; 35 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 20 с) на термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

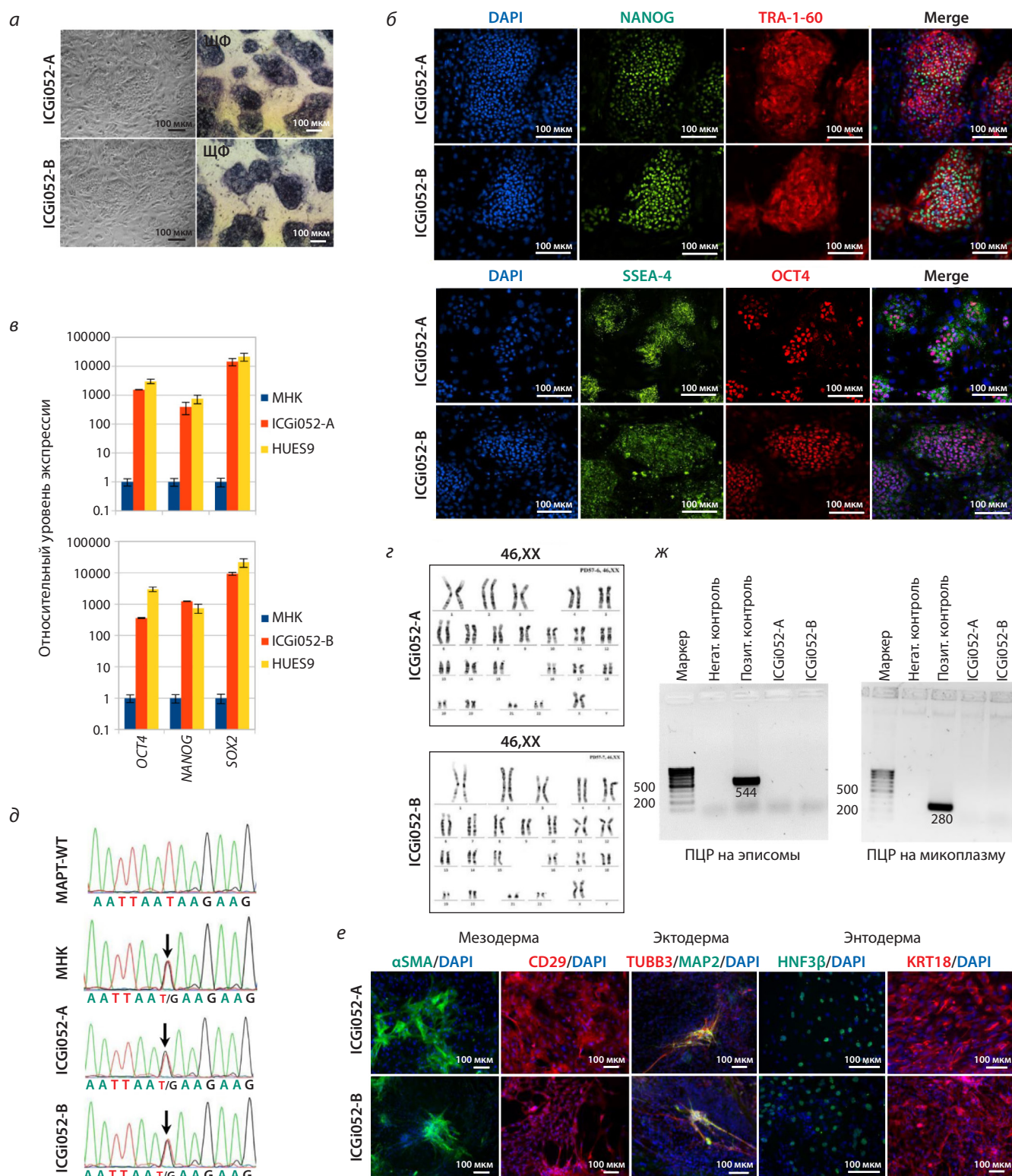
STR-анализ. Генотипирование исследуемых образцов ДНК выполняли в ООО «Геноаналитика» методом полимеразной цепной реакции с применением набора ПЦР реа-

гентов для прямой амплификации COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» (Россия) согласно протоколу фирмы-производителя, с последующим разделением продуктов амплификации на приборе для проведения капиллярного электрофореза 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems Group of The Applera Corporation, Япония, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2004/1586).

Результаты и обсуждение
При анализе результатов секвенирования экзомов пациентов Федерального центра нейрохирургии (Новосибирск) с клиническим диагнозом болезнь Паркинсона была обнаружена 46-летняя пациентка, имевшая патогенный генетический вариант (с.2013T>G, rs63750756) в гене *MAPT*, ассоциированный с лобно-височной деменцией с паркин-

Таблица 3. Паспорт клеточных линий ICGi052-A и ICGi052-B

Уникальный идентификатор	ICGi052-A, ICGi052-B
Альтернативное название линий	PD57-6, PD57-7
Учреждение	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 46 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2021 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и trp53DD
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17
Ген/локус	MAPT:c.2013T>G, rs63750756
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных теллец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	In vitro модель лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластах мыши
Среда культивирования	85 % KnockOut DMEM, 15 % KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 1 % пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	ЭДТА 0.5 mM
Кратность посева	1:8–1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi052-A , https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi052-B
Дата паспортизации/депонирования	09.07.2024



Характеристика двух пациент-специфичных линий ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B.

а – морфология колоний клеток в фазовом контрасте и гистохимическое выявление эндогенной щелочной фосфатазы (ЩФ) в ИПСК; **б** – иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: NANOG (зеленый сигнал), TRA-1-60 (красный), OCT4 (красный сигнал); **в** – ПЦР в реальном времени на маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG) линий ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B, MNC пациента и линии эмбриональных стволовых клеток HUES9; **г** – кариотипирование (DAPI-бэндинг) линий ИПСК: ICGi052-A на 18-м пассаже и ICGi052-B на 20-м пассаже; **д** – секвенирование участков гена *MART* (с.2013T>G) MNC пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, линий ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B и здорового донора (*MART*-WT) (секвенирование по Сэнгеру), полиморфизм отмечен черной стрелкой; **е** – иммунофлуоресцентное окрашивание спонтанно дифференцированных в эмбриональных тельцах клеток на маркеры трех зародышевых листков: эктодермы (TUBB3 (красный сигнал), MAP2 (зеленый)), мезодермы (αSMA (зеленый), CD29 (красный)) и энтодермы (кератин 18/KRT18 (красный сигнал), HNF3β/FOXA2 (зеленый)). Ядра окрашены DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) (синий сигнал); **ж** – результат ПЦР анализа на эписомы в клетках и контаминацию микоплазмой в линиях полученных клеток. Все масштабные линейки – 100 мкм.

сонизмом-17. Первые признаки паркинсонизма у пациентки были обнаружены в 44 года. В семейном анамнезе все родственники по женской линии имели признаки заболевания.

Из периферической крови пациентки были выделены МНК и проведено репрограммирование при помощи трансфекции неинтегрирующимися эписомами, экспрессирующими OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и mp53DD (Okita et al., 2013). В результате получено десять линий клеток. Начальные этапы анализа выявили две линии, которые отвечали всем требованиям, предъявляемым к плюрипотентным стволовым клеткам. Данные линии (ICGi052-A/PD57-6 и ICGi052-B/PD57-7) были охарактеризованы и зарегистрированы в Реестре плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>). Полная информация по линиям доступна в hPSCreg по ссылкам <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi052-A> и <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi052-B>.

Обе линии растут плотными однослойными колониями клеток с большим ядерно-цитоплазматическим соотношением и экспрессируют ранний маркер плюрипотентных клеток – эндогенную щелочную фосфатазу (см. рисунок, а). Культивирование осуществлялось на митотически инактивированных фибробластах мыши (или фидере). Иммунофлуоресцентный анализ линии клеток ICGi052-A (15-й пассаж) и ICGi052-B (16-й пассаж) на маркеры плюрипотентности показал наличие экспрессии поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1-60, а также транскрипционных факторов NANOG и OCT4 (см. рисунок, б). Количественная ПЦР в реальном времени (ОТ-кПЦР) полученных линий на 15-м пассаже также демонстрировала значительное повышение уровня экспрессии генов OCT4, NANOG и SOX2, сопоставимое с уровнем экспрессии в контрольной линии эмбриональных стволовых клеток HUES9 (HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004) (см. рисунок, в). Анализ кариотипа, включающий 60 метафазных пластинок каждой линии клеток, показал, что линии клеток ICGi052-A на 18-м пассаже и ICGi052-B на 20-м пассаже имеют нормальные диплоидные кариотипы 46,XX (см. рисунок, г). Для подтверждения наличия в полученных линиях клеток патогенного полиморфизма было проведено секвенирование по методу Сэнгера и подтверждено, что обе линии, так же как и МНК пациента, несут замену с.2013T>G (см. рисунок, д, полиморфизмы отмечены черными стрелками).

Основным тестом на плюрипотентность полученных линий клеток является их способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, в связи с чем была проведена спонтанная дифференцировка в эмбрионидных тельцах с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием на специфические маркеры. Обе линии клеток способны давать: эктодерму (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2)); энтодерму (ядерный фактор гепатоцитов 3 бета (HNF3β/FOXA2), кератин 18 (KRT18)); мезодерму (α-актин гладких мышц (αSMA), поверхностный маркер CD29) (см. рисунок, е).

В процессе культивирования все линии проходили ПЦР тест на контаминацию микоплазмой, который под-

тверждал ее отсутствие (см. рисунок, ж). Также к 19-му пассажиру произошла элиминация эписомных векторов. STR-анализ коротких tandemных повторов по 25 полиморфным локусам на 15-м (для линии ICGi052-A) и 16-м (для линии ICGi052-B) пассажах показал идентичность пациент-специфичным МНК (данные доступны по запросу у авторов). Паспорт полученных клеточных линий представлен в табл. 3.

Заключение

Из МНК пациентки с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, имеющей патологический генетический вариант с.2013T>G (rs63750756) в гене MAPT, при помощи репрограммирования к плюрипотентному состоянию нами были созданы и детально охарактеризованы две линии ИПСК – ICGi052-A и ICGi052-B. Данные линии клеток отвечают всем критериям плюрипотентных клеток (имеют диплоидный кариотип, экспрессируют маркеры плюрипотентности и способны давать производные трех зародышевых листков) и являются уникальным молекулярно-генетическим инструментом для изучения *in vitro* развития патологии в нейральных производных, полученных при направленной дифференцировке ИПСК, а также тестирования новых фармакологических соединений. Исследуемые линии клеток зарегистрированы в международном Реестре плюрипотентных стволовых клеток человека hPSCreg, а также включены в коллекцию клеток лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН и могут быть использованы для изучения механизмов развития таупатий.

Список литературы / References

- Britti E., Ros J., Esteras N., Abramov A.Y. Tau inhibits mitochondrial calcium efflux and makes neurons vulnerable to calcium-induced cell death. *Cell Calcium*. 2020;86:102150. DOI 10.1016/j.ceca.2019.102150
- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C., Andrin R., Magtoto L. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. *Mol. Cell Probes*. 1998;12(5):301-308. DOI 10.1006/mcpr.1998.0186
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med*. 2004;350(13):1353-1356. DOI 10.1056/NEJMs040330
- Dawson H.N., Cantillana V., Chen L., Vitek M.P. The tau N279K exon 10 splicing mutation recapitulates frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 tauopathy in a mouse model. *J. Neurosci*. 2007;27(34):9155-9168. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5492-06.2007
- D'Souza I., Schellenberg G.D. Arginine/serine-rich protein interaction domain-dependent modulation of a tau exon 10 splicing enhancer: altered interactions and mechanisms for functionally antagonistic FTDP-17 mutations Δ280K and N279K. *J. Biol. Chem*. 2006;281:2460-2469. DOI 10.1074/jbc.M505809200
- Esmaeli-Azad B., McCarty J.H., Feinstein S.C. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell Sci*. 1994; 107(4):869-879. DOI 10.1242/jcs.107.4.869
- Esteras N., Kundel F., Amodeo G.F., Pavlov E.V., Klennerman D., Abramov A.Y. Insoluble tau aggregates induce neuronal death through modification of membrane ion conductance, activation








- of voltage-gated calcium channels and NADPH oxidase. *FEBS J.* 2021;288(1):127-141. DOI 10.1111/febs.15340
- Ghetti B., Oblak A.L., Boeve B.F., Johnson K.A., Dickerson B.C., Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by *microtubule-associated protein tau gene (MAPT)* mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2015;41(1):24-46. DOI 10.1111/nan.12213
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S *GBA* variant carriers with and without Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(5):4437. DOI 10.3390/ijms24054437
- Hasegawa M., Smith M.J., Iijima M., Tabira T., Goedert M. FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett.* 1999;443(2):93-96. DOI 10.1016/S0014-5793(98)01696-2
- Hernández F., Merchán-Rubira J., Vallés-Saiz L., Rodríguez-Matellán A., Avila J. Differences between human and murine tau at the N-terminal end. *Front. Aging Neurosci.* 2020;12:11. DOI 10.3389/fnagi.2020.00011
- Iovino M., Agathou S., González-Rueda A., Del Castillo Velasco-Herrera M., Borroni B., Alberici A., Lynch T., O'Dowd S., Geti I., Gaffney D., Vallier L., Paulsen O., Káradóttir R.T., Spillantini M.G. Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain.* 2015;138(11):3345-3359. DOI 10.1093/brain/awv222
- Korn L., Speicher A.M., Schroeter C.B., Gola L., Kaehne T., Engler A., Disse P., Fernández-Orth J., Csáti J., Naumann M., Seebohm G., Meuth S.G., Schöler H.R., Wiendl H., Kovac S., Pawlowski M. MAPT genotype-dependent mitochondrial aberration and ROS production trigger dysfunction and death in cortical neurons of patients with hereditary FTL. *Redox Biol.* 2023;59:102597. DOI 10.1016/j.redox.2022.102597
- Liu G., David B.T., Trawczynski M., Fessler R.G. Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications. *Stem Cell Rev. Rep.* 2020;16(1):3-32. DOI 10.1007/s12015-019-09935-x
- Lynch T., Sano M., Marder K.S., Bell K.L., Foster N.L., Defendini R.F., Sima A.A., Keohane C., Nygaard T.G., Fahn S., Mayeux R., Rowland L., Wilhelmsen K. Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex. *Neurology.* 1994;44(10):1878-1884. DOI 10.1212/wnl.44.10.1878
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells.* 2013;31(3):458-466. DOI 10.1002/stem.1293
- Ritter M.L., Avila J., García-Escudero V., Hernández F., Pérez M. Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutation localizes at the nuclear compartment. *Front. Cell. Neurosci.* 2018;12:202. DOI 10.3389/fncel.2018.00202
- Valetdinova K.R., Malankhanova T.B., Zakian S.M., Medvedev S.P. The cutting edge of disease modeling: synergy of induced pluripotent stem cell technology and genetically encoded biosensors. *Biomedicines.* 2021;9(8):960. DOI 10.3390/biomedicines9080960
- Wren M.C., Zhao J., Liu C.-C., Murray M.E., Atagi Y., Davis M.D., Fu Y., Okano H.J., Ogaki K., Strongosky A.J., Tacik P., Rademakers R., Ross O.A., Dickson D.W., Wszolek Z.K., Kanekiyo T., Bu G. Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Mol. Neurodegener.* 2015;10:46. DOI 10.1186/s13024-015-0042-7

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.07.2024. После доработки 28.08.2024. Принята к публикации 02.09.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-77

Сравнительный анализ первичной структуры и получение рекомбинантной поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 долгоживущего *Heterocephalus glaber*

К.Н. Наumenко ¹, А.Р. Нурисламов ², К.Д. Назаров¹, В.С. Фишман ², А.А. Попов ¹, И.О. Петрусева ¹,
А.Н. Евдокимов¹, О.И. Лаврик ^{1, 3} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 lavrik@niboch.nsc.ru








Аннотация. Репарация ДНК – важнейший клеточный процесс, который способствует поддержанию целостности генома. В настоящее время эффективная работа систем репарации ДНК рассматривается исследователями как один из ключевых факторов, определяющих максимальную продолжительность жизни. Центральным регулятором процесса репарации ДНК является фермент поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1), способный синтезировать полимер поли(ADP-рибозы) (PAR) в ответ на повреждение ДНК и присоединять его к белкам-мишеням, в число которых входит и сам PARP1, осуществляя тем самым посттрансляционную модификацию этих белков и регулируя их сродство к ДНК. PARP1 принимает участие и во многих других процессах, ассоциированных с клеточным старением, таких как поддержание целостности теломер и развитие воспалительной реакции. Свойства PARP1 как изолированного белка практически не исследовались у млекопитающих, которые демонстрируют высокую максимальную продолжительность жизни, за исключением человека. Одним из перспективных объектов таких исследований считается голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), имеющий экстремально высокую максимальную продолжительность жизни, а также более эффективно функционирующие системы репарации ДНК, которые обеспечивают высокую устойчивость его клеток к воздействию ряда генотоксических агентов, по сравнению с другими мелкими грызунами, например, близкой по размеру и массе тела мышью (*Mus musculus*). В настоящей работе проведено сравнение аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа с аминокислотными последовательностями белков-ортологов других млекопитающих. В отличие от PARP1 человека, в аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа выявлено 13 эволюционно консервативных аминокислотных замен в различных функциональных доменах белка. С использованием поиска в базах данных последовательности кДНК гена *Parp1* голого землекопа и последующего анализа путем выравнивания транскриптомных данных выбрана соответствующая экспрессируемому варианту *Parp1* последовательность кДНК, которая была клонирована с помощью экспрессионного вектора на основе плазмиды pLate31. В результате экспрессии в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3)GeneX и очистки, проведенной с использованием трех хроматографических стадий, впервые был получен и охарактеризован функционально активный фермент PARP1 голого землекопа.

Ключевые слова: поли(ADP-рибоза)полимераза 1; репарация ДНК; *Heterocephalus glaber*.

Для цитирования: Наumenко К.Н., Нурисламов А.Р., Назаров К.Д., Фишман В.С., Попов А.А., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Лаврик О.И. Сравнительный анализ первичной структуры и получение рекомбинантной поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 долгоживущего *Heterocephalus glaber*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(7):688-695. DOI 10.18699/vjgb-24-77

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-74-10056П).


Comparative analysis of the primary structure and production of recombinant poly(ADP-ribose)polymerase 1 of long-lived *Heterocephalus glaber*

K.N. Naumenko ¹, A.R. Nurislamov ², K.D. Nazarov¹, V.S. Fishman ², A.A. Popov ¹, I.O. Petrusheva ¹,
A.N. Evdokimov¹, O.I. Lavrik ^{1, 3} 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 lavrik@niboch.nsc.ru

Abstract. DNA repair is a most important cellular process that helps maintain the integrity of the genome and is currently considered by researchers as one of the factors determining the maximum lifespan. The central regulator of the DNA repair process is the enzyme poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1). PARP1 catalyzes the synthesis of poly(ADP-ribose) polymer (PAR) upon DNA damage using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as a substrate. This polymer covalently attaches to PARP1, which leads to its dissociation from the complex with damaged DNA and stimulation of the repair process. Despite intensive research on PARP1, its properties as an isolated protein have not been practically studied in mammals that demonstrate a long maximum lifespan, such as, for example, the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). High activity of DNA repair systems is observed in the cells of the naked mole rat, which ensures their high resistance to oxidative stress, as well as to genotoxic effects. The revealed features may be due to the high activity of PARP1 in the cells of the naked mole rat; however, this issue remains poorly understood and, thus, requires more detailed research, including one with the use of isolated protein PARP1 of the naked mole rat, the isolation and characterization of which have not been carried out before. In the present work, the amino acid sequence of PARP1 of the naked mole rat is compared with the amino acid sequences of orthologous proteins of other mammals. In contrast to human PARP1, 13 evolutionarily conservative amino acid substitutions in various functional domains of the protein have been identified in the amino acid sequence of naked mole rat PARP1. Using the cDNA of the naked mole rat's *Parp1* gene, a vector was created for the expression of the target protein in *Escherichia coli* cell culture. For the first time, a detailed description of the procedure for the expression and purification of the recombinant protein PARP1 of the long-lived naked mole rat is presented. In addition, poly(ADP-ribose)polymerase activity of the obtained protein was evaluated. The results presented in this paper are the basis for further detailed characterization of the properties of purified recombinant naked mole rat PARP1.

Key words: poly(ADP-ribose)polymerase 1; DNA repair; *Heterocephalus glaber*.

For citation: Naumenko K.N., Nurislamov A.R., Nazarov K.D., Fishman V.S., Popov A.A., Petrusheva I.O., Evdokimov A.N., Lavrik O.I. Comparative analysis of the primary structure and production of recombinant poly(ADP-ribose)polymerase 1 of long-lived *Heterocephalus glaber*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):688-695. DOI 10.18699/vjgb-24-77

Введение

Одной из главных причин старения является нестабильность генома, которая может развиваться в результате накопления повреждений геномной ДНК, образующихся при неблагоприятном воздействии экзогенных и эндогенных факторов (López-Otín et al., 2023). В устранении последствий этих неблагоприятных воздействий и поддержании целостности генома важную роль играет репарация ДНК. Эффективная работа систем репарации ДНК рассматривается как один из факторов, способствующих долголетию (Schumacher et al., 2021). В связи с этим актуальным направлением исследований стало изучение механизмов и особенностей функционирования систем репарации ДНК в клетках млекопитающих, которые демонстрируют высокую продолжительность жизни.

К перспективным объектам таких исследований может быть отнесен голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), имеющий более высокую максимальную продолжительность жизни по сравнению с близкой по размеру и массе тела мышью (*Mus musculus*) (Buffenstein, 2005; Gorbunova et al., 2014). Согласно результатам проведенных к настоящему времени сравнительных исследований, в клетках голого землекопа наблюдается более высокая активность систем репарации ДНК и устойчивость к воздействию некоторых генотоксических агентов (метанметилсульфонат, паракват, эпопозид и т.д.), чем в клетках мыши (Salmon et al., 2008; MacRae et al., 2015; Evdokimov et al., 2018, 2021). Для того чтобы выяснить возможные причины этих особенностей, необходимо проведение исследований на изолированных белках землекопа, участвующих в репарации ДНК.

Центральным регулятором репарации ДНК в клетках млекопитающих является фермент поли(ADP-рибоза) полимеразы 1 (PARP1), который, используя NAD⁺ в качестве

субстрата, катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (PAR), а кроме того способен использовать PAR для проведения ковалентной модификации белков – как самого PARP1 – авто-поли(ADP-рибозил)ирование, так и молекул других белков-акцепторов – транс-поли(ADP-рибозил)ирование. Показано, что PARP1 модулирует активность ферментов репарации, их взаимодействие с поврежденной ДНК и привлечение к местам повреждения ДНК (Sinha et al., 2021; Bilkis et al., 2023; Rouleau-Turcotte, Pascal, 2023). Кроме того, PARP1 участвует в образовании «немембранных компартментов», которые формируются с участием полимера PAR, ковалентно присоединенного к PARP1. В таких компартментах концентрируются поврежденная ДНК и белки репарации, что способствует повышению эффективности процесса репарации ДНК (Singatulina et al., 2019; Leung, 2020; Alemasova, Lavrik, 2022). Все это определяет PARP1 как ключевой фактор в регуляции эффективности репарации ДНК и обеспечении стабильности генома.

В одном из первых исследований, направленных на поиск этой взаимосвязи, сравнительная оценка поли(ADP-рибоза)полимеразной активности в клетках тринадцати видов млекопитающих, из которых человек обладал самой высокой максимальной продолжительностью жизни, выявила наличие положительной корреляции между активностью PARP и продолжительностью жизни (Grube, Bürkle, 1992). Позже при исследовании кинетики реакции PARилирования, катализируемой рекомбинантными PARP1 человека (*Homo sapiens*) и короткоживущей серой крысы (*Rattus norvegicus*), были найдены различия, которые говорят о более эффективной работе фермента человека (Beneke et al., 2000, 2010).

Помимо того, при исследовании эффективности систем репарации в клетках голого землекопа и мыши нами были

показаны более высокая активность синтеза PAR в клетках голого землекопа по сравнению с клетками мыши, так же как и более высокое содержание белка PARP1, детектированное с помощью его ковалентных пришивок к ДНК (Evdokimov et al., 2018). Представлялось интересным изучение свойств PARP1 голого землекопа и сравнение свойств этих белков из разных организмов. Свойства PARP1 голого землекопа как изолированного белка прежде не изучались, поскольку препарат индивидуального белка был недоступен.

Целью данной работы было получение рекомбинантной PARP1 голого землекопа, для того чтобы в дальнейшем исследовать свойства этого белка и провести их сравнение со свойствами PARP1 других млекопитающих. Для достижения поставленной цели нами впервые проведен сравнительный анализ аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа с белками-ортологами других млекопитающих. По результатам биоинформатического анализа баз данных была выбрана последовательность кДНК, соответствующая экспрессируемому варианту гена *Parp1* голого землекопа. Выбранная последовательность была использована для клонирования в плазмидный вектор pLate31, что позволило впервые провести экспрессию в клетках *E. coli*, очистку и характеризацию рекомбинантного PARP1 этого долгоживущего грызуна.

Материалы и методы

Олигодезоксинуклеотиды. В работе использованы олигодезоксинуклеотиды, последовательность которых представлена в таблице. Олигодезоксинуклеотиды 1–3 были синтезированы в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Праймеры pLate31-PARP1-For и pLate31-PARP1-Rev были производства ООО «ДНК-Синтез» (Москва, Россия).

Эволюционный анализ первичной структуры PARP1 голого землекопа. Для выявления аминокислотных замен, уникальных для PARP1 голого землекопа, было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей PARP1 данного вида и других млекопитающих. В анализ включили ортологи PARP1 десяти видов животных, включая трех грызунов (*Fukomys damarensis*, *M. musculus*, *R. norvegicus*) и широкую филогенетическую группу из шести видов млекопитающих (*H. sapiens*, *Equus caballus*, *Dasyurus novemcinctus*, *Loxodonta africana*, *Monodelphis domestica*, *Ornithorhynchus anatinus*). Аминокислотные последовательности PARP1 выбранных видов загружали из публичных баз данных

NCBI и Ensembl. Множественное выравнивание выполняли в web-версии Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

Культивирование клеток. Фибробласты кожи голого землекопа (линия NSF8) культивировали в αMEM-среде, содержащей 15 % FBS, 10 % AmnioMAX, 0.005 мкг/мл bFGF, смесь антибиотик/антимикотик (Gibco, США) при температуре 32 °C и 5 % CO₂.

Выделение суммарной РНК из фибробластов голого землекопа и получение кДНК. Полученную культуру клеток промывали 5 мл PBS от остатков среды и добавляли 1 мл раствора TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки ресуспендировали до гомогенной суспензии и переносили в чистую пробирку. Добавляли 200 мкл хлороформа, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 16000 g при 4 °C. После центрифугирования отбирали верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Полученный образец переосаждали изопропиловым спиртом. Осажденную РНК растворяли в 200 мкл воды и добавляли равный объем смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1). После центрифугирования отбирали водную фазу и переосаждали РНК этанолом.

Для наработки кДНК *Parp1* реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 4 мкг суммарной РНК и 100 нмоль oligo dT, инкубировали 2 мин при 70 °C, после чего добавляли буфер для обратной транскрипции и 1 мкл обратной транскриптазы ОТ-MMLV (100 ед. активности/мкл; «Биолабмикс», Россия). Реакцию проводили в течение часа при 42 °C.

Создание вектора для экспрессии PARP1. ПЦР продукт, содержащий кодирующую транскрируемую часть кДНК PARP1 голого землекопа, которая была фланкирована специфичными нуклеотидными последовательностями, получали с использованием пары праймеров pLate31-PARP1-For/pLate31-PARP1-Rev (см. таблицу). Полученный продукт переосаждали в 96 % этаноле. Очищенный ПЦР продукт растворяли в 10 мкл LIC-буфера, после чего к реакционной смеси добавляли 1 мкл ДНК-полимеразы фага T4 (1 ед. активности/мкл; Thermo Fisher Scientific, США). Смесь тщательно перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 50 мМ. Далее к реакционной смеси добавляли 20 фмоль линейаризованной формы вектора pLate31 (Thermo Scientific, США), содержащей комплементарные «липкие» концы, перемешивали и инкубировали 5 мин при комнат-

Последовательности олигодезоксинуклеотидов и праймеров, использованных в работе

Наименование	Последовательность (5'-3')
Олигодезоксинуклеотид 1	ggcgataaagttggg
Олигодезоксинуклеотид 2	aacgtcagggctctcc
Олигодезоксинуклеотид 3	ggaagaccctgacgttccaactttatcgcc
pLate31-PARP1-For	agaaggagatataactatgatggccgaggcagcggac
pLate31-PARP1-Rev	gtgggtggtgatgggtgatggcccccacaggaggagacttaaaattgaac

ной температуре. Полученным препаратом плазмидной ДНК проводили трансформацию клеток *E. coli* штамма XLBlue.

Определение суммарного уровня поли(ADP-рибозы), синтезируемой в реакции автоPARилирования. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 100, 200, 400 нМ рекомбинантного белка PARP1, 100 нМ ДНК-дуплекс размером 32 п.н. с одноцепочечным разрывом (получен путем гибридизации олигодезоксинуклеотидов 1–3, см. таблицу), 400 мкМ NAD⁺ и [³²P]-меченный NAD⁺ (0.4 мкКи). Реакцию запускали добавлением NAD⁺ с последующей инкубацией реакционных смесей в течение 10 мин при 37 °С. Останавливали реакцию путем нанесения реакционной смеси на мишени из хроматографической бумаги (GE Healthcare, США), предварительно инкубированной в 10 % ТХУ. Избыток меченного [³²P]-NAD⁺, не включившегося в PAR, удаляли последовательной отмывкой мишеней в 5 % ТХУ и этаноле. Бумагу подсушивали, уровень синтеза PAR оценивали по суммарной радиоактивности продуктов реакции путем радиоавтографии с использованием прибора Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare, США).

Выделение и очистка рекомбинантного белка PARP1. Клетки *E. coli* BL21(DE3)GeneX, трансформированные плазмидой pLate31-PARP1, инкубировали в системе автоиндукции по методу Штудия в среде LB, содержащей 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ KH₂PO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0.5 % глицерин, 0.05 % глюкозу, 0.2 % лактозу и ампициллин (100 мкг/мл) в течение 18 ч при 37 °С. После инкубации клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, супернатант отбирали и осажденные клетки хранили при –70 °С.

Для приготовления клеточного лизата полученную биомассу ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 10 % глицерин, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол, 0.5 мМ PMSF и смесь ингибиторов протеаз из расчета 5 мл буфера на 1 г биомассы клеток. После инкубации на льду в течение 20 мин к смеси добавляли равный объем буферного раствора, содержащего 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 2 М NaCl, 2 % NP-40, 10 % глицерин, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.5 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз. Суспензию обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе при 40 кГц в течение 20 мин с охлаждением до 4 °С. Полученный лизат центрифугировали при 30000 g 30 мин в роторе Beckman JA 25.50.

Осветленный лизат пропускали через колонку, содержащую в качестве сорбента Ni-NTA-агарозу (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, 5 мМ имидазол. Затем носитель последовательно промывали буфером уравнивания до стабилизации базовой линии и буфером 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0.1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, 5 мМ имидазол до стабилизации базовой линии. Хроматографическое разделение на Ni-NTA проводили элюцией буферным раствором, содержащим 250 мМ имидазол. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 5 мл гепарин-сефарозы (GE Healthcare, США). Хроматографическое разделение

на гепарин-сефарозе проводили в режиме изократической промывки буфером, содержащим 0.3 М NaCl для промывки от слабосвязанного нецелевого белка, и буфером, содержащим 1 М NaCl для элюции целевого белка. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и разбавляли в 10 раз буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 5 мл оцДНК-целлюлозы (Sigma, США). Хроматографическое разделение на оцДНК-целлюлозе проводили в условиях, аналогичных разделению белков на гепарин-сефарозе.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы определить, имеются ли в структуре PARP1 голого землекопа характерные эволюционно консервативные аминокислотные замены, которые потенциально могут повлиять на функциональные свойства этого фермента, мы провели сравнение аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа с аминокислотными последовательностями белков-ортологов других млекопитающих. Аминокислотная последовательность PARP1 высококонсервативна у млекопитающих, на что указывает высокий уровень гомологии среди ортологов белка (более 90 %), несмотря на дивергенцию, произошедшую свыше 150 млн лет назад (рис. 1, а). PARP1 голого землекопа также сохраняет все функциональные домены, присутствующие в PARP1 других млекопитающих. Значительная часть последовательности белка консервативна, однако в PARP1 голого землекопа мы идентифицировали несколько замен в высококонсервативных сайтах функциональных доменов (см. рис. 1, б); часть этих замен присутствует также у дамасского пескороя (*F. damarensis*) – родственного вида из семейства землекоповых (Bathyergidae). Выявленные замены могут повлиять на узнавание PARP1 поврежденной ДНК и на каталитические функции этого фермента.

В результате поиска последовательности кДНК гена *Parp1* голого землекопа в базах данных и последующего анализа с помощью выравнивания транскриптомных данных для различных органов голого землекопа (мозг – SRS899007; тестикулы – SRR1959204; печень – ERS1090459) на три альтернативные матрицы *Parp1* была выбрана последовательность кДНК (NCBI NM_001310226.1 (Bens et al., 2016)), соответствующая экспрессируемому варианту *Parp1*. Эта кДНК была взята нами для амплификации и последующего клонирования.

Для получения рекомбинантной PARP1 голого землекопа в клетках *E. coli* был использован экспрессионный вектор на основе плазмиды pLate31 (Thermo Scientific, США). С помощью специфических праймеров и суммарной кДНК фибробластов голого землекопа методом ПЦР была амплифицирована кодирующая последовательность PARP1. Полученный ПЦР-продукт отжигали с линейризованным вектором pLate31 и проводили трансформацию клеток *E. coli* XLBlue для амплификации плазмидной ДНК. Отсутствие ошибок в амплифицированной последовательности подтвердили методом секвенирования по Сэнгеру.

При поиске оптимальных условий экспрессия PARP1 проводилась в штаммах *E. coli* (BL21(DE3), BL21(DE3)

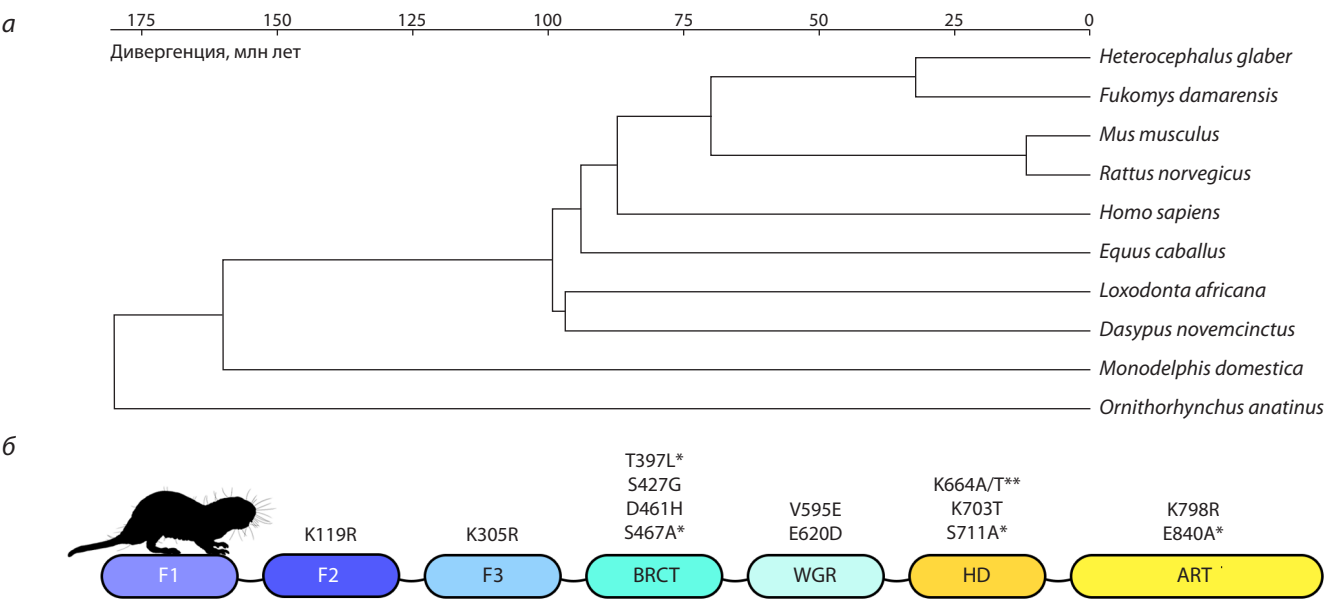


Рис. 1. Эволюционный анализ первичной структуры белка PARP1.
а – список видов млекопитающих, включенных в анализ, и их дивергенция; б – уникальные для голого землекопа замены аминокислот в PARP1. * Замены, присутствующие также у дамарецкого пескодея; ** варианты замен из баз данных NCBI и Ensembl.

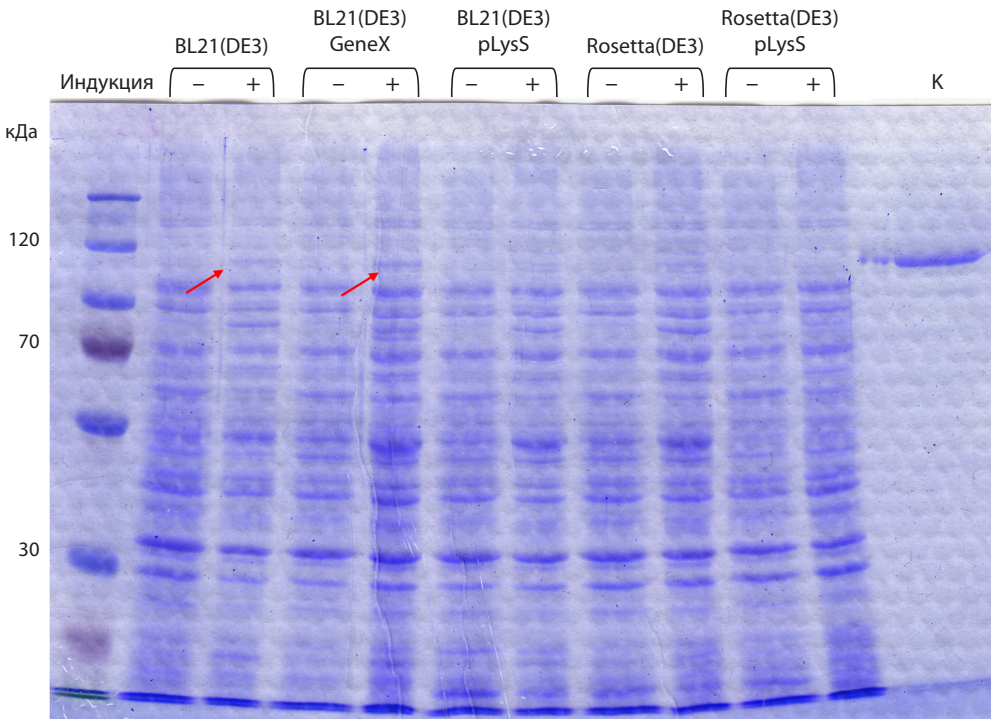


Рис. 2. Анализ содержания PARP1 в лизатах трансформированных клеток *E. coli*.
Клетки культивировали в системе автоиндукции при 37 °С в отсутствие (индукция «–») и в присутствии (индукция «+») лактозы. Положение белка PARP1 показано красными стрелками. К – рекомбинантный белок PARP1 человека.

pLysS, BL21(DE3)GeneX, Rosetta(DE3) и Rosetta(DE3)pLysS). Появление целевого белка в клетках *E. coli* после индукции по сравнению с неиндуцированными клетками было визуально обнаружено только при электрофоретическом анализе белков, экспрессированных в штаммах клеток BL21(DE3) и BL21(DE3)GeneX (рис. 2).

Выбранные условия культивирования использовали для наработки препаративного количества биомассы клеток BL21(DE3)GeneX, трансформированных вектором pLate31-PARP1. Полученную биомассу лизировали с последующей обработкой в ультразвуковом дезинтеграторе и центрифугировали для осаждения дебриса. Далее

последовательно проводили три хроматографические стадии очистки на колонках, содержащих в качестве сорбента Ni-NTA (рис. 3, а), гепарин-сефарозу (б), оцДНК-целлюлозу (в) (Sukhanova et al., 2004).

За наличием целевого белка следили путем электрофоретического анализа с окрашиванием по Лэмбли (рис. 4). Фракции, содержащие очищенный препарат белка, концентрировали с помощью центрифужных фильтров. Степень очистки препарата проверяли электрофорезом с последующим окрашиванием Coomassie R250.

Концентрация белка в конечном препарате, определенная по методу Брэдфорда, составила 0.5 мг/мл. Суммарный выход – 0.3 мг белка на 10 г биомассы клеток *E. coli*.

Для проверки активности полученного рекомбинантного белка использовали систему *in vitro*, содержащую радиоактивно меченный NAD⁺ и модельную поврежденную ДНК, содержащую разрыв и свободные тупые концы в качестве кофактора для активации реакции синтеза PAR, катализируемой PARP1 (рис. 5). Как видно из представленных данных, выделенный белок обладает ферментативной активностью в реакции автоPARилирования и пригоден для дальнейшего исследования его свойств.

В сравнительных исследованиях активности систем репарации ДНК в клетках голого землекопа и мыши (*M. musculus*) было показано, что системы эксцизионной репарации оснований (BER) и нуклеотидов (NER) клеток голого землекопа обеспечивают более эффективное удаление объемных повреждений, а также поврежденных оснований, чем аналогичные системы клеток мыши (Evdokimov et al., 2018). Активность PARP1 была также заметно выше в клетках долгоживущего голого землекопа, чем в клетках короткоживущей мыши (Evdokimov et al., 2018). Дальнейшее развитие работы предполагает определение характера взаимодействия выделенного белка PARP1 голого землекопа с белками-партнерами в процессе репарации ДНК, влияния этих белков на активность PARP1, а также определение сродства PARP1 к поврежденной ДНК.

Получение рекомбинантных белков, таких сложных по структуре и функциям, как PARP1, не является рутинной задачей и требует подбора оптимальных условий наработки, выделения и очистки, которые могут значительно отличаться от стандартно применяемых. Использование сочетания описанных выше методов позволило нам успешно провести клонирование, наработку в системе экспрессии *E. coli* и хроматографическую очистку белка PARP1 голого землекопа. Предложенная процедура очистки белка, включающая, помимо хроматографии на Ni-NTA, две «псевдоаффинные» колонки в отработанных нами буферных и солевых условиях, может быть использована для эффективной очистки рекомбинантного PARP1 голого землекопа.

Данные, полученные в результате впервые проведенного нами сравнительного анализа аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа и человеческого белка-ортолога, говорят о том, что две замены, обнаруженные в ответственным за синтез PAR ART-домене, не затронули каталитическую триаду и кинетические параметры при синтезе PAR ферментами этих двух долгожителей, вероятно, не будут значительно различаться. Тем не менее

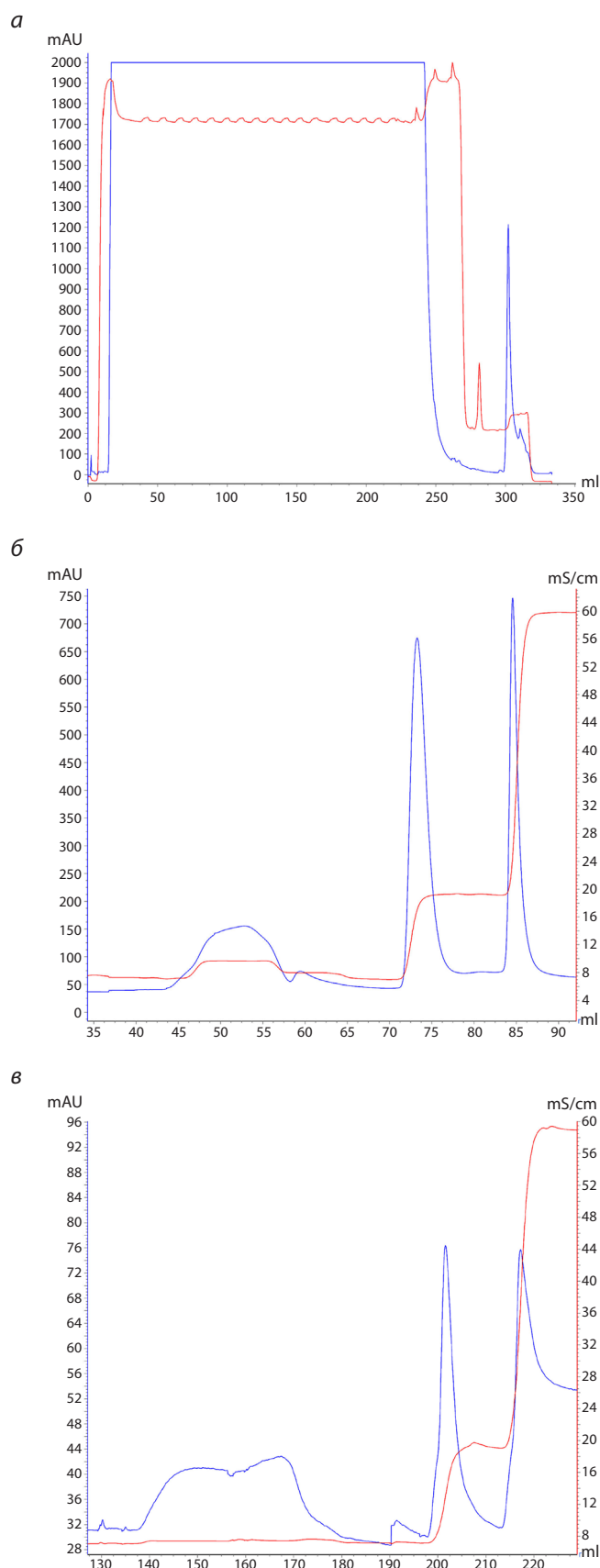


Рис. 3. Профили элюции белка PARP1 (*H. glaber*) с Ni-NTA-агарозы (а), гепарин-сефарозы (б), оцДНК-целлюлозы (в).

Синяя линия – оптическая плотность раствора при длине волны 280 нм (10^{-3} о. е.); красная линия – проводимость раствора (мСм/см).

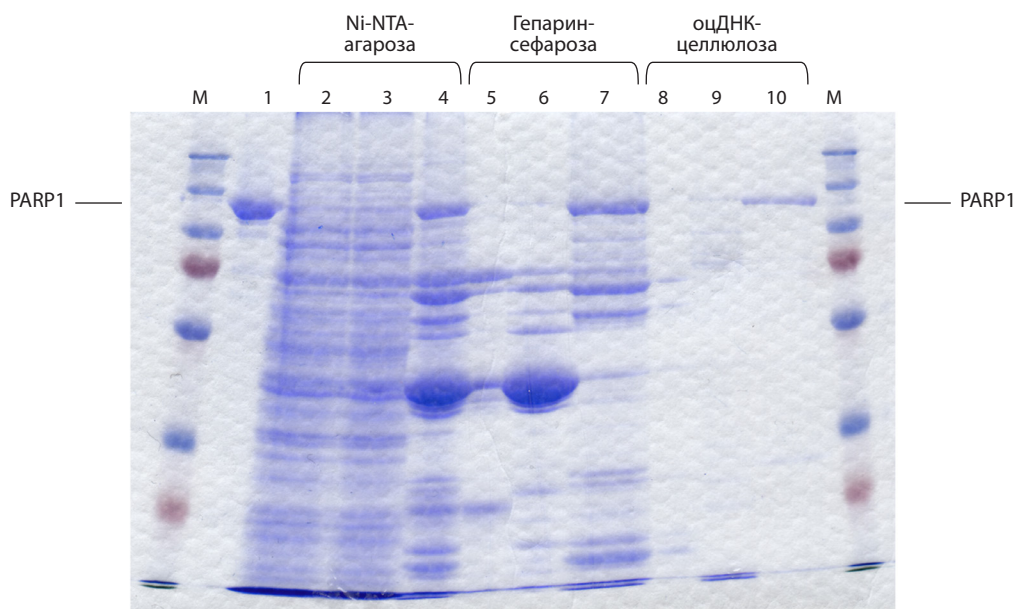


Рис. 4. Электрофореграмма, отражающая стадии очистки рекомбинантного PARP1 голого землекопа.

1 – контрольный образец белка; 2–4 – нанесение, пропуск и элюция с Ni-NTA-агарозы соответственно; 5 – пропуск с гепарин-сефарозы; 6, 7 – элюция с гепарин-сефарозы 0.3 и 1 M NaCl соответственно; 8 – пропуск с оцДНК-целлюлозы; 9, 10 – элюция целевого белка с оцДНК-целлюлозы 0.3 и 1 M NaCl соответственно.

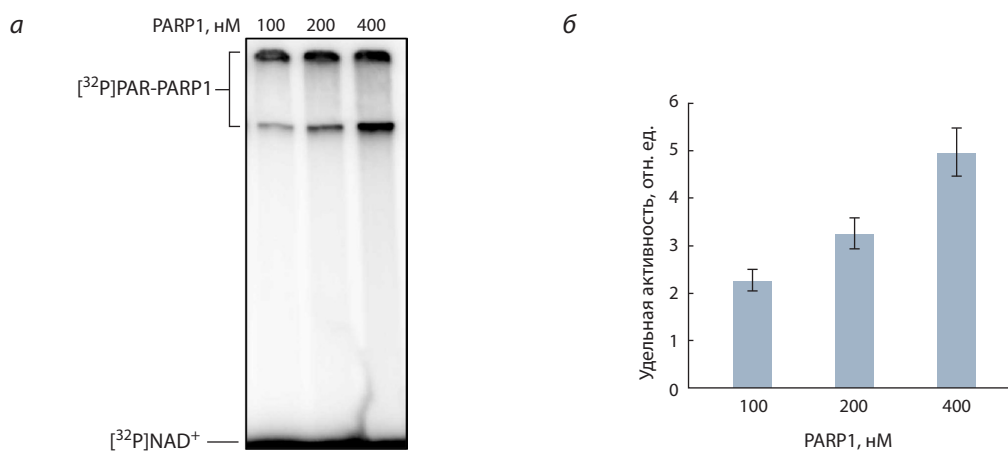


Рис. 5. Анализ активности рекомбинантного PARP1 голого землекопа в реакции автоПАРилирования.

а – радиоавтограф 10%-го SDS-ПААГ, в котором проводилось разделение продуктов модификации белков; б – диаграмма, суммирующая результаты трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (см. Материалы и методы).

замены в других функциональных доменах, происходящие со сменой типа остатка (появление более гидрофобного или смена нейтрального остатка на остаток, несущий заряд, и т. п.), особенно если это происходит в непосредственной близости от мишеней автоПАРилирования, Asp и Glu, как, например, замена K305R в домене Zn3, D461N в домене BRCT, а также замены аминокислотных остатков, участвующих в междоменных взаимодействиях, могут влиять на свойства белка. Это возможно исследовать далее с использованием мутантных форм PARP1 голого землекопа, содержащих в своем составе замены вышеперечисленных аминокислотных остатков.

Заключение

Изучение свойств PARP1 различных долгоживущих млекопитающих является перспективным направлением исследований, поскольку может способствовать более глубокому пониманию роли репарации ДНК в старении и того, как организован этот процесс в клетках млекопитающих.

Сравнение аминокислотных последовательностей PARP1 двух млекопитающих с высокой максимальной продолжительностью жизни, голого землекопа и человека, выявило 13 эволюционно консервативных замен в белке голого землекопа. Влияние этих замен на свойства и функции PARP1 предстоит выяснить. Кроме того, были

впервые выполнены клонирование PARP1 голого землекопа, а также наработка в клетках *E. coli* и очистка рекомбинантного белка с использованием достаточно простой процедуры, оценена его способность к проведению реакции автоПАРилирования. В дальнейших работах будет проведено сравнение свойств рекомбинантных PARP1 долгоживущих голого землекопа и человека, которое не выполнялось ранее.

Список литературы / References

- Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) in condensates: the partnership of phase separation and site-specific interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(22):14075. DOI 10.3390/ijms232214075
- Beneke S., Alvarez-Gonzalez R., Bürkle A. Comparative characterisation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 from two mammalian species with different life span. *Exp. Gerontol.* 2000;35(8):989-1002. DOI 10.1016/s0531-5565(00)00134-0
- Beneke S., Scherr A.L., Ponath V., Popp O., Bürkle A. Enzyme characteristics of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases-1 of rat and human origin mirror the correlation between cellular poly(ADP-ribosylation) capacity and species-specific life span. *Mech. Ageing Dev.* 2010;131(5):366-369. DOI 10.1016/j.mad.2010.04.003
- Bens M., Sahm A., Groth M., Jahn N., Morhart M., Holtze S., Hildebrandt T.B., Platzer M., Szafranski K. FRAMA: from RNA-seq data to annotated mRNA assemblies. *BMC Genomics.* 2016;17:54. DOI 10.1186/s12864-015-2349-8
- Bilkis R., Lake R.J., Cooper K.L., Tomkinson A., Fan H.Y. The CSB chromatin remodeler regulates PARP1- and PARP2-mediated single-strand break repair at actively transcribed DNA regions. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(14):7342-7356. DOI 10.1093/nar/gkad515
- Buffenstein R. The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2005;60(11):1369-1377. DOI 10.1093/gerona/60.11.1369
- Evdokimov A., Kutuzov M., Petrusheva I., Lukjanchikova N., Kashina E., Kolova E., Zemerova T., Romanenko S., Perelman P., Prokopov D., Seluanov A., Gorbunova V., Graphodatsky A., Trifonov V., Khodyreva S., Lavrik O. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Aging (Albany NY).* 2018;10(6):1454-1473. DOI 10.18632/aging.101482
- Evdokimov A., Popov A., Ryabchikova E., Koval O., Romanenko S., Trifonov V., Petrusheva I., Lavrik I., Lavrik O. Uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat. *Aging (Albany NY).* 2021;13(3):3239-3253. DOI 10.18632/aging.202577
- Gorbunova V., Seluanov A., Zhang Z., Gladyshev V.N., Vijg J. Comparative genetics of longevity and cancer: insights from long-lived rodents. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(8):531-540. DOI 10.1038/nrg3728
- Grube K., Bürkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89(24):11759-11763. DOI 10.1073/pnas.89.24.11759
- Leung A.K.L. Poly(ADP-ribose): a dynamic trigger for biomolecular condensate formation. *Trends Cell Biol.* 2020;30(5):370-383. DOI 10.1016/j.tcb.2020.02.002
- López-Otín C., Pietrocola F., Roiz-Valle D., Galluzzi L., Kroemer G. Meta-hallmarks of aging and cancer. *Cell Metab.* 2023;35(1):12-35. DOI 10.1016/j.cmet.2022.11.001.5
- MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A., Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., Zhang Z.D., Vijg J. DNA repair in species with extreme lifespan differences. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1171-1184. DOI 10.18632/aging.100866
- Rouleau-Turcotte É., Pascal J.M. ADP-ribose contributions to genome stability and PARP enzyme trapping on sites of DNA damage; paradigm shifts for a coming-of-age modification. *Biol. Chem.* 2023; 299(12):105397. DOI 10.1016/j.jbc.2023.105397
- Salmon A.B., Sadighi Akha A.A., Buffenstein R., Miller R.A. Fibroblasts from naked mole-rats are resistant to multiple forms of cell injury, but sensitive to peroxide, ultraviolet light, and endoplasmic reticulum stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008;63(3):232-241. DOI 10.1093/gerona/63.3.232
- Schumacher B., Pothof J., Vijg J., Hoeijmakers J.H.J. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature.* 2021;592(7856):695-703. DOI 10.1038/s41586-021-03307-7
- Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M.V., Desforbes B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastré D. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell Rep.* 2019;27(6):1809-1821.e5. DOI 10.1016/j.celrep.2019.04.031
- Sinha S., Molla S., Kundu C.N. PARP1-modulated chromatin remodeling is a new target for cancer treatment. *Med. Oncol.* 2021;38(10):118. DOI 10.1007/s12032-021-01570-2
- Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits strand-displacement synthesis of DNA catalyzed by DNA polymerase beta. *Biochemistry (Moscow).* 2004;69(5):558-568. DOI 10.1023/b:biry.0000029855.68502.f8


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.04.2024. После доработки 25.07.2024. Принята к публикации 25.07.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-78

Концепция природной реконструкции генома.

Часть 1. Основные положения концепции природной реконструкции генома. Изменение генома гемопоэтических стволовых клеток с использованием нескольких природных клеточных механизмов, имманентно присущих гемопоэтической стволовой клетке и определяющих ее биологический статус как «источник репаративного потенциала организма»

Л.А. Якубов¹, О.С. Таранов², С.В. Сидоров², С.Д. Никонов³, А.А. Останин⁴, Е.Р. Черных⁴,
Н.А. Колчанов⁵, С.С. Богачев⁵ 

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. Предлагается вниманию цикл статей, доказывающий существование ранее неизвестного механизма взаимодействия гемопоэтической стволовой клетки и экстраклеточной двуцепочечной ДНК (в частности, двуцепочечной ДНК периферического кровяного русла), который объясняет возможность появления и закрепления в гемопоэтических стволовых клетках генетической информации, содержащейся в двуцепочечной ДНК внеклеточного происхождения. Сформулирована концепция возможности стохастического или целенаправленного изменения генома гемопоэтических стволовых клеток, основанная на открытии новых, ранее неизвестных биологических свойств низкодифференцированных гемопоэтических предшественников. Основные положения концепции заключаются в следующих тезисах. Гемопоэтическая стволовая клетка захватывает и интернализует фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК естественным природным механизмом. В акте интернализации принимают участие специфические группы факторов гликокаликса, к которым относятся гликопротеины/протеогликаны, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки и скавенджер-рецепторы. Сайтами связывания фрагментов ДНК являются гепарин-связывающие домены и кластеры положительно заряженных аминокислотных остатков, входящих в состав белковых молекул указанных факторов. Доставленные во внутренние компартменты гемопоэтических стволовых клеток экстраклеточные фрагменты инициируют терминальную дифференцировку, колониюобразование и пролиферацию предшественников гемопоэза. Молекулярным событием, отражающим эти процессы, является возникновение и репарация пангеномных одноцепочечных разрывов. Процесс возникновения пангеномных одноцепочечных разрывов и восстановление целостности генома (геномной ДНК) сопряжен с активацией в клетке «рекомбиногенной ситуации», во время активной фазы которой возможны стохастическая гомологичная рекомбинация или иные рекомбинационные события между экстраклеточными фрагментами, локализованными в ядре, и ДНК хромосом. Генетический материал исходно экстраклеточной локализации или интегрирует в реципиентный геном с замещением гомологичных хромосомных сегментов, или транзитно присутствует в ядре и может проявляться как новый генетический признак. Предполагается, что в результате стохастических актов гомологичного обмена происходит коррекция локусов хромосом в гемопоэтических стволовых клетках, получивших в ходе существования организма мутации, которые являются причиной клонального гемопоэза, ассоциированного со старостью. В этой связи возникает принципиальная возможность изменения статуса гемопоэза гемопоэтических стволовых клеток в направлении поликлональности и исходного многообразия клонов. Такие события могут составить основу омоложения кроветворяющей системы клеток. Результаты работ свидетельствуют, что другие стволовые клетки организма также захватывают фрагменты экстраклеточной ДНК. Этот факт создает парадигму общего омоложения организма.

Ключевые слова: экстраклеточная ДНК; интернализация; одноцепочечные разрывы; коммитирование.

Для цитирования: Якубов Л.А., Таранов О.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 1. Основные положения концепции природной реконструкции генома. Изменение генома гемопоэтических стволовых клеток с использованием нескольких природных клеточных механизмов, имманентно присущих гемопоэтической стволовой клетке и определяющих ее биологический статус как «источник репаративного потенциала организма». *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):696-705. DOI 10.18699/vjgb-24-78

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики (государственный бюджетный проект № FWNR-2022-0016) и при поддержке И.Н. Зайцевой и А.А. Пуртова.

Благодарности. Авторы выражают благодарность генеральному директору АО Клинический госпиталь «Нейровита», профессору, д.м.н. А.С. Брюховецкому за активный интерес к рассматриваемой концепции.

The concept of natural genome reconstruction.

Part 1. Basic provisions of the “natural genome reconstruction” concept. Changing the genome of hematopoietic stem cells using several natural cellular mechanisms that are inherent in the hematopoietic cell and determine its biological status as “the source of the body’s reparative potential”

L.A. Yakubov¹, O.S. Taranov², S.V. Sidorov², S.D. Nikonov³, A.A. Ostanin⁴, E.R. Chernykh⁴,
N.A. Kolchanov⁵, S.S. Bogachev⁵ 


¹ State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

² City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

⁴ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

⁵ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. We present a series of articles proving the existence of a previously unknown mechanism of interaction between hematopoietic stem cells and extracellular double-stranded DNA (and, in particular, double-stranded DNA of the peripheral bloodstream), which explains the possibility of emergence and fixation of genetic information contained in double-stranded DNA of extracellular origin in hematopoietic stem cells. The concept of the possibility of stochastic or targeted changes in the genome of hematopoietic stem cells is formulated based on the discovery of new, previously unknown biological properties of poorly differentiated hematopoietic precursors. The main provisions of the concept are as follows. The hematopoietic stem cell takes up and internalizes fragments of extracellular double-stranded DNA via a natural mechanism. Specific groups of glycocalyx factors, including glycoproteins/proteoglycans, glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and scavenger receptors, take part in the internalization event. The binding sites for DNA fragments are heparin-binding domains and clusters of positively charged amino acid residues that are parts of protein molecules of these factors. Extracellular fragments delivered to the internal compartments of hematopoietic stem cells initiate terminal differentiation, colony formation, and proliferation of hematopoietic precursors. The molecular manifestation of these processes is the emergence and repair of pangenomic single-strand breaks. The occurrence of pangenomic single-strand breaks and restoration of genome (genomic DNA) integrity are associated with activation of a “recombinogenic situation” in the cell; during its active phase, stochastic homologous recombination or other recombination events between extracellular fragments localized in the nucleus and chromosomal DNA are possible. As a result, genetic material of initially extracellular localization either integrates into the recipient genome with the replacement of homologous chromosomal segments, or is transitively present in the nucleus and can manifest itself as a new genetic trait. It is assumed that as a result of stochastic acts of homologous exchange, chromosome loci are corrected in hematopoietic stem cells that have acquired mutations during the existence of the organism, which are the cause of clonal hematopoiesis associated with old age. In this regard, there is a fundamental possibility of changing the hematopoietic status of hematopoietic stem cells in the direction of polyclonality and the original diversity of clones. Such events can form the basis for the rejuvenation of the blood-forming cell system. The results of the laboratory’s work indicate that other stem cells in the body capture extracellular DNA fragments too. This fact creates a paradigm for the overall rejuvenation of the body.

Key words: extracellular DNA; internalization; single-strand breaks; commitment.

For citation: Yakubov L.A., Taranov O.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 1. Basic provisions of the “natural genome reconstruction” concept. Changing the genome of hematopoietic stem cells using several natural cellular mechanisms that are inherent in the hematopoietic cell and determine its biological status as “the source of the body’s reparative potential”. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):696-705. DOI 10.18699/vjgb-24-78

Двцепочечная ДНК и эффекты ее воздействия на эукариотическую клетку и организм в целом

Двцепочечная фрагментированная экстраклеточная экзогенная и эндогенная ДНК является участником, индуктором и индикатором различных процессов, протекающих в организме. В первую очередь экзогенные нуклеиновые кислоты являются патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, активирующими различные звенья иммунной системы, направленные на удаление патогена. Экстраклеточная двцепочечная ДНК (дцДНК) эндоген-

ного происхождения также может выступать в качестве активатора иммунного ответа организма (Medzhitov, Janeway, 2000; Krieg, 2002; Takeshita, Ishii, 2008; Iwasaki, Medzhitov, 2010; Barbalat et al., 2011; Bode et al., 2011). Фрагменты как экзогенной, так и эндогенной дцДНК, доставленные в цитоплазму иммунных клеток, активируют палитру цитозольных сенсоров и индуцируют начальные этапы развития адаптивного иммунного ответа (Barber, 2011a, b; Sharma, Fitzgerald, 2011). дцДНК является индуктором аутоиммунных процессов (Guiducci et al., 2010;

Pisetsky, Ullal, 2010; Almqvist et al., 2011; Choubey, 2012; Kaczorowski et al., 2012) и представляет собой один из сигналов эффекта свидетеля, определяющего передачу через инкубационную среду метаболических/катаболических реакций, индуцированных в клетках, подверженных определенному воздействию (облучению), интактным клеткам-свидетелям (Ermaikov et al., 2009). Показано, что «взрывное» увеличение концентрации ДНК в плазме крови приводит к системной воспалительной реакции и сепсису (Saukkonen et al., 2007; Castellheim et al., 2009; Amalich et al., 2010; Kaczorowski et al., 2012). Нуклеиновые кислоты, включая дцДНК, входят в состав экзосом и, как предполагается, могут быть «камертоном» функционального состояния организма, по которому определенные популяции клеток «настраивают» свои физиологические и молекулярные процессы (Cai et al., 2013; Rashed et al., 2017).

На клеточном уровне фрагменты дцДНК (а именно открытые двуцепочечные концы этих фрагментов), доставленные во внутреннее пространство неиммунной клетки, активируют арест клеточного цикла и индуцируют репаративные процессы (MacDougall et al., 2007; Zou, 2007). При определенных условиях эти фрагменты становятся участниками репаративного процесса, интерферируя его корректное прохождение, и, согласно полученным в лаборатории экспериментальным данным, могут интегрировать в реципиентный геном (Likhacheva et al., 2007; Лихачева и др., 2008; Dolgova et al., 2012).

Вопрос горизонтального переноса генетического материала хорошо изучен у прокариот, многократно показан для низших многоклеточных животных (Andersson, 2005; Soucy et al., 2015; Sibbald et al., 2020), и есть доказанные примеры переноса генов у млекопитающих. Так, известен процесс поглощения ДНК разрушенных раковых клеток другими «чувствительными» клетками организма, в результате чего происходит раковая трансформация этих клеток. Процесс назван «генометастазирование» (Yakubov et al., 2007; García-Olmo et al., 2012). В работах (Bergsmedh et al., 2001; Holmgren et al., 2002; Sakamoto et al., 2023) приводятся доказательства горизонтального переноса генов при поглощении апоптотических телец и экстраклеточных везикул. Известна работа переноса экстраклеточного материала в яйцеклетку сперматозоидами, захватившими высокополимерную ДНК из окружающей среды у мидий (Ерохин, Кузнецов, 2009). В недавнем исследовании (Xia et al., 2021) показан горизонтальный перенос специфического уникального гена между насекомым и растением. В 2007 г. была присуждена Нобелевская премия за разработку технологии, в которой основополагающим является гомологичная рекомбинация доставленных внутрь клетки фрагментов нокаутной ДНК (<https://lenta.ru/articles/2007/10/08/nobelmed/>).

В рамках проблемы горизонтального переноса генетической информации у эукариот и, в частности, у человека возникли и последовательно решались несколько принципиальных вопросов. Вопросы о путях появления ДНК одного организма в другом и о механизме распространения этих ДНК по организму были решены современными экспериментальными подходами и техниками молекулярной биологии. Вопросы о том, что является точкой фиксации

новой генетической информации в реципиентном организме и каким образом пришедший с ней признак будет проявлен как новая биологическая особенность, до настоящего времени остаются нерешенными.

Существует несколько объективных источников и путей появления чужеродной ДНК в организме. Это манипуляции с кровью, различные трансплантации, половой акт, ношение плода, появление ДНК продуктов питания в организме вместе с приемом пищи, вирусная или бактериальная инфекция, общий микробиом организма.

После того как было доказано, что в периферической крови любого организма присутствует определенное количество экстраклеточной ДНК, вопрос существования и распространения в организме чужеродной ДНК также был решен (Anker et al., 1999; Jahr et al., 2001; Laktionov et al., 2004). Очевидно, что при манипуляциях с кровью и трансплантации в обязательном порядке произойдет попадание донорской ДНК, будь то кровь или строма, в реципиентный организм. ДНК разрушенных сперматозоидов, так же как и ДНК плода, попадает в кровь организма, и наоборот (Schubbert et al., 1998; Bianchi, Dennis Lo, 2001). Появление экзогенной ДНК в организме через желудочно-кишечный тракт убедительно продемонстрировано в работах (Schubbert et al., 1994, 1997; Hohlweg, Doerfler, 2001; Palka-Santini et al., 2003). Микробиота кишечника представлена несколькими килограммами основного ее представителя *Escherichia coli*. При разрушении клеток кишечника выделяется огромное количество ДНК, тоже попадающей в кровоток. Именно на основании этого явления разработаны и внедрены в практику методы диагностики состояния кишечной микрофлоры по анализу сыроворотки/плазмы крови (<https://lenta.ru/articles/2007/10/08/nobelmed/>). Это означает, что в организме всегда, помимо собственной ДНК разрушенных апоптозом или некрозом клеток или ДНК симбиотической микрофлоры, будет присутствовать ДНК, пришедшая извне, и существует материальная основа оборота как чужеродной, так и собственной генетической информации в организме.

Последний вопрос и связанные с ним идеи о месте фиксации новой генетической информации и ее манифестации как нового биологического признака в настоящее время в научной литературе практически не дискутируются вследствие отсутствия идей их решения.

Очевидно, чтобы признак проявился, его носитель, а именно дцДНК, должен попасть в клетку. Существует множество исследований, демонстрирующих факт интернализации экстраклеточных ДНК фрагментов в различные типы клеток, однако до выхода наших работ (Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022; Potter et al., 2024) не было описания механизма и упорядоченной структуры факторов такой интернализации. В цитируемых работах установлено, что фрагменты экстраклеточной дцДНК доставляются в стволовую эукариотическую клетку кавеоло-зависимым механизмом с участием гепарин-связывающих доменов и кластеров положительно заряженных аминокислот гликопротеинов/протеогликанов, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренных белков и скавенджер-рецепторов гликокаликса. Основным фактором интернализации является общий положительный заряд стволовой клетки различного генеза.

В настоящее время формируется позиция, предполагающая, что экстраклеточные нуклеиновые кислоты, включая дцДНК, представляют собой новый тип регуляторной системы организма, со сложными механизмами регуляции клеточных процессов, одно из проявлений которого – горизонтальный перенос генетической информации (Ledoux, 1965; Ratajczak et al., 2006; Cocucci et al., 2009; Simons, Raposo, 2009; Camussi et al., 2010; Balaj et al., 2011; Tetta et al., 2011; Ludwig, Giebel, 2012; Ronquist, 2012; Raposo, Stoorvogel, 2013).

История появления концепции природной реконструкции генома

Концепция природной реконструкции генома – способность реконструировать (патологически) измененный «хроматиновый рельеф» (как изменения на нуклеотидном уровне, так и связанные с этим изменения организации хроматина более высоких порядков) – представляет собой возможность *in vivo*, *ex vivo*, *in situ* молекулярного изменения («исправления»), в случае если это является причиной заболевания) мутантных локусов хромосом (или замена «здорового на здоровое» без изменения первичной нуклеотидной последовательности), в котором используется принцип дополнительного реконструирующего субстрата в виде «генетического материала» – фрагментов экстраклеточной дцДНК.

Основу концепции составляют пять базовых общебиологических явлений, три из которых недавно открыты и описаны для стволовой клетки в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск).

1. Присутствие фрагментов экстраклеточной дцДНК в периферической крови (Anker et al., 1999; Jahr et al., 2001; Laktionov et al., 2004).
2. Способность стволовых клеток различного генеза интернализировать фрагменты двуцепочечной ДНК естественным природным механизмом (рис. 1). В механизме интернализации принимают участие: заряд клеточной поверхности, домены связывания гепарина и кластеры положительно заряженных аминокислот, протеогликаны/гликопротеины и скавенджер-рецепторы гликокаликса. Интернализация происходит за счет кавеоларного/клатринового пути (Dolgova et al., 2014; Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022).
3. Индукция терминальной дифференцировки стволовых клеток доставленными во внутриклеточные компартменты фрагментами дцДНК (рис. 2). На мышинной модели нами было установлено, что экстраклеточные фрагменты дцДНК в форме ПЦР-фрагментов, суперскрученной ДНК плазмид, фрагментированной геномной дцДНК интернализируются в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) естественным природным механизмом. До 14000 копий ПЦР-фрагментов ~500 п.о. (что составляет ~0.2 % гаплоидного генома) могут одновременно находиться во внутриклеточных компартментах c-Kit+/Sca1+/CD34+ ГСК и мультипотентных потомков. Доставленные во внутреннее клеточное пространство фрагменты дцДНК индуцируют терминальную дифференцировку прогенитора, активацию пролиферации клеток-потомков и рост колоний на ми-

крокристаллической целлюлозе. При этом количество колоний увеличивается на 15–40 % по сравнению с необработанными образцами (Potter et al., 2024). В колониях большая часть клеток (для мышинной модели) представляет собой клетки в состоянии терминальной дифференцировки с утратой маркеров примитивных предшественников (для мыши это c-Kit+/Sca1+). Меньшая часть клеток (до 15 %) сохраняет маркеры незрелых клеток. Это свидетельствовало о том, что первично активированные обработкой Lin–/c-Kit+/Sca1+ ГСК при формировании колоний делятся как несимметрично, давая коммитированных предшественников гемопоэза, так и симметрично, увеличивая пул низкодифференцированных прогениторов (Potter et al., 2024). Количество ГСК в суммарном пуле клеток колоний было на несколько порядков выше, чем в исходном образце клеток костного мозга. Этот факт свидетельствует, что найден механизм амплификации (до 15 % примитивных клеток для мышинной модели) нового признака, исходно возникшего в ГСК клеток костного мозга (0.01 % примитивных клеток).

4. Ранее было обнаружено, что в эмбриональных стволовых клетках млекопитающих после индукции их терминальной дифференцировки обработкой ретиноевой кислотой формируются пангеномные одноцепочечные разрывы, которые восстанавливаются, согласно опубликованным результатам, через 96 ч (Vatolin et al., 1997) (рис. 3). Появление пангеномных одноцепочечных разрывов переводит хроматин ядра в релаксированную форму. В результате последующей репарации одноцепочечных разрывов восстанавливается целостность генома и создается новая трехмерная архитектура хроматина с учетом новых торсионных напряжений, определяющих его новую 3D организацию в выбранном направлении дифференцировки. Считается, что такое «вскрытие» генома необходимо для реорганизации топологии хроматина из стволового состояния в коммитированное (Farzaneh et al., 1982; Johnstone, Williams, 1982). Появление и репарация пангеномных одноцепочечных разрывов представляют собой в чистом виде репаративно-рекомбинационный процесс, манифестирующий появление в клетке «рекомбиногенной ситуации» (Лихачева и др., 2008). Репаративно-рекомбинационная молекулярная «машина», осуществляющая процесс разрыва и восстановления хроматина, неизвестна.
5. Способность интернализованных фрагментов дцДНК участвовать в репаративных процессах (индуцированных самими фрагментами либо иными факторами), протекающих в клетке, в качестве или субстрата, или внешней матрицы для гомологичной рекомбинации (Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016, 2017, 2024; Ruzanova et al., 2022).

Приведенный выше анонс экспериментальных материалов свидетельствует, что при попадании дцДНК внутрь ГСК происходит индукция терминальной дифференцировки (коммитирование) и связанная с ней активация пролиферации прогениторов. Мы полагаем, что аналогично процессу терминальной дифференцировки и возникновению пангеномных одноцепочечных разрывов, наблюдаемых в эмбриональных стволовых клетках,

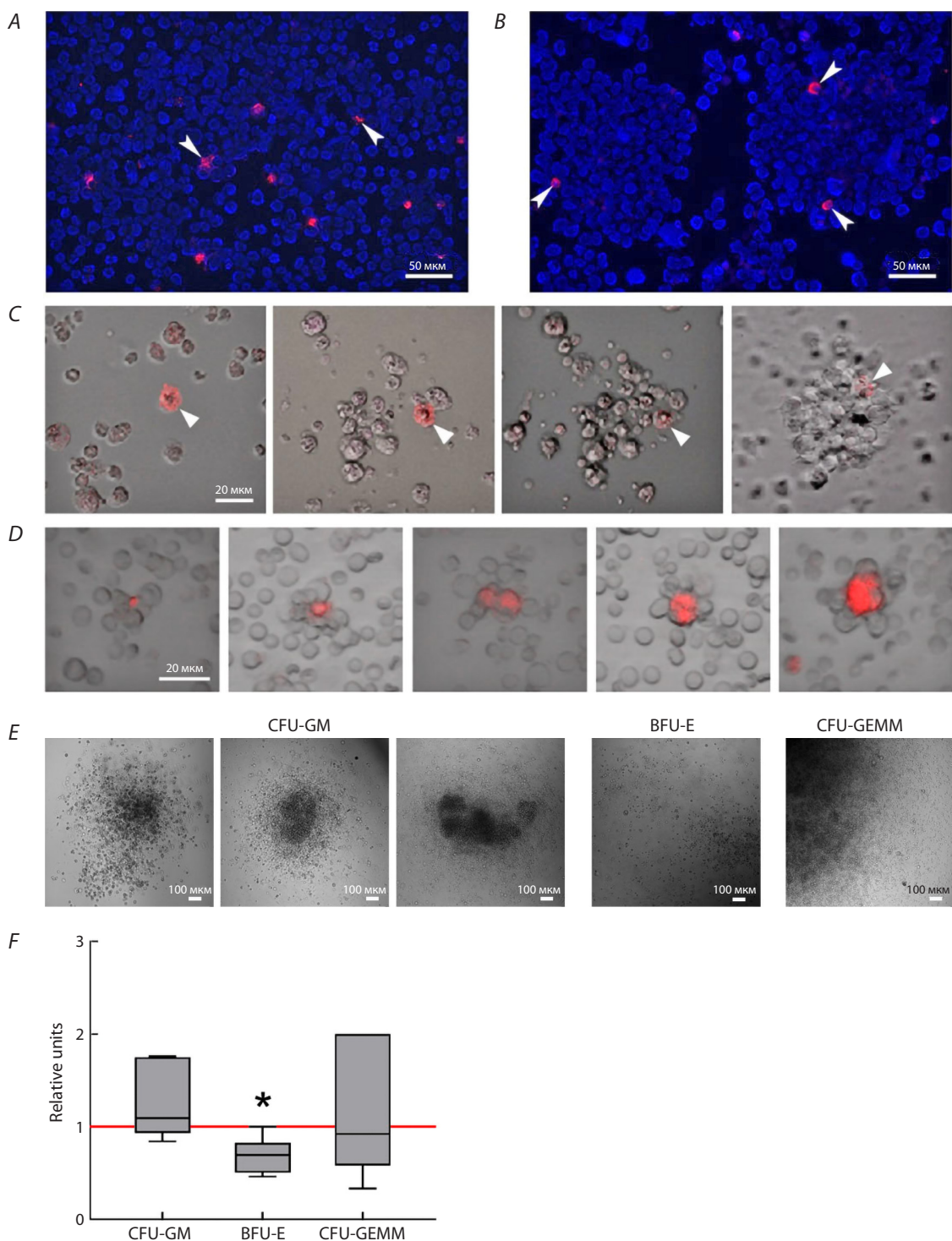


Рис. 1. Интернализация TAMRA-зонда ДНК в стволовые клетки Krebs-2 (A) и В лимфомы, трансформированной вирусом Эпштейна–Барра (B). Стрелками обозначены TAMRA+ клетки. На рисунке B видны две сферы. C – сферообразование в культуре клеток лимфомы, трансформированной вирусом Эпштейна–Барра. TAMRA+ клетка в течение 20–30 мин объединяется с несколькими близко расположенными клетками. В процессе наблюдения все клетки, находящиеся в поле зрения, находятся в непрерывном хаотическом движении. При контакте клеток с TAMRA+ клеткой формируется прочный ассоциат, на основе которого в течение 8–14 ч формируется свободно плавающая сфера (Dolgova et al., 2016, 2019). D – розетки костномозговых стромальных ниш, в центре которых находятся TAMRA+ клетки (Ritter et al., 2022). E – морфология анализируемых колоний гранулоцитарно-макрофагального (CFU-GM), эритроидного (BFU-E) и миелоидного (CFU-GEMM) ростков кроветворения при индукции препаратом hDNA^{9f}. F – стимуляция колониеобразования гранулоцитарно-макрофагального (CFU-GM), эритроидного (BFU-E) и миелоидного (CFU-GEMM) ростков кроветворения при индукции препаратом hDNA^{9f} в сравнении с контролем. Значения представляют собой отношение количества колоний при индукции препаратом к числу контрольных колоний, принятому за «1» и обозначенному красной линией. Данные представлены в виде медианы, межквартильного диапазона и минимум–максимум диапазона. * – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$, парный тест Уилкоксона, $n = 6$) (Potter et al., 2024).

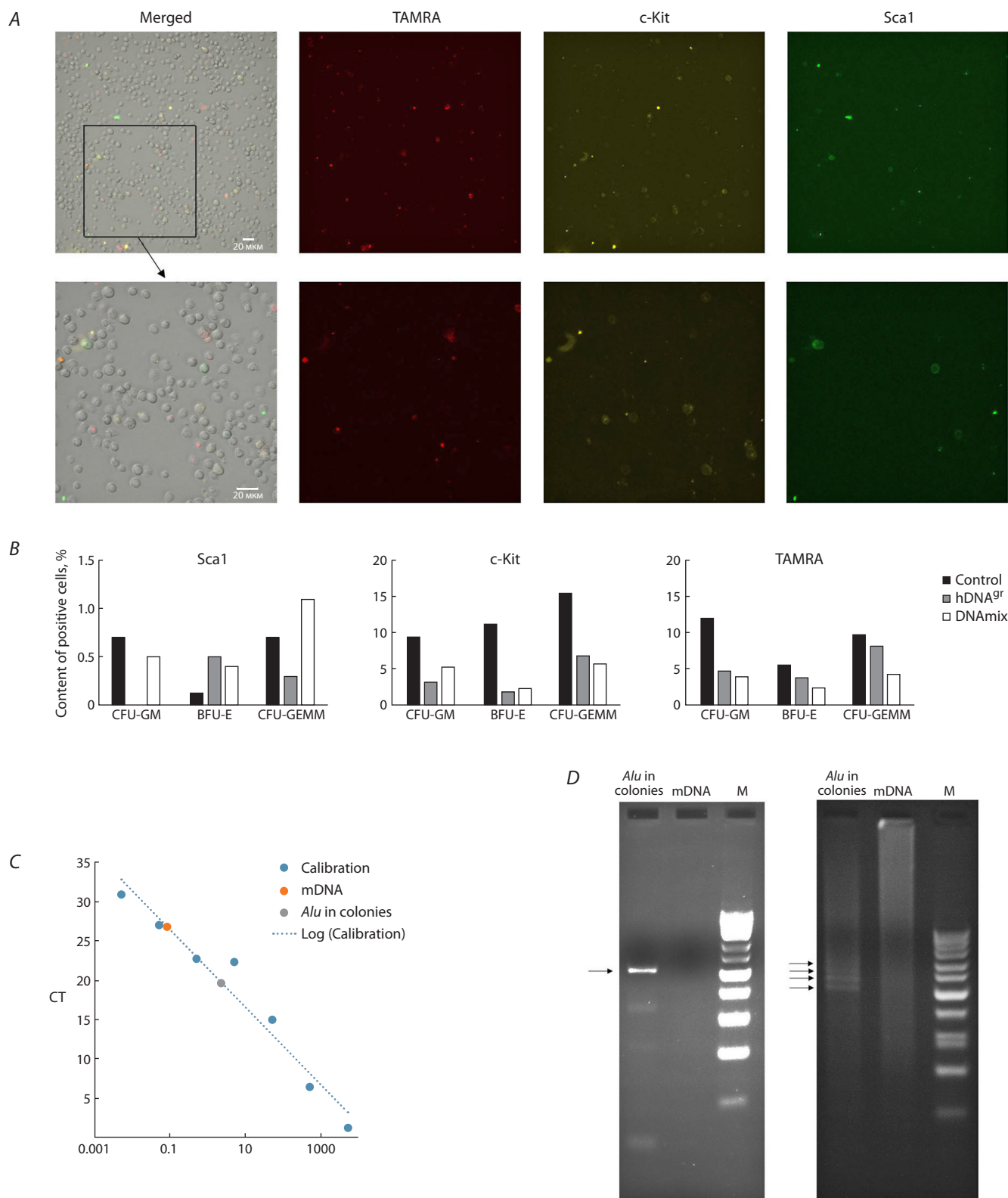


Рис. 2. Анализ интернализации двуцепочечного ДНК зонда в ГСК.

A – оценка совместной локализации маркеров примитивных ГСК c-Kit и Sca1 и одновременно способности этих клеток интернализировать двуцепочечный TAMRA+ зонд ДНК в интактном костном мозге мыши. **B** – сравнительные графики содержания клеток, меченных соответствующим маркером, в популяции клеток отдельной колонии. Снижение количества клеток, меченных по маркерам стволовости, может означать, что при индукции препаратом ДНК стволовые клетки ушли в дифференцировку. **C** – анализ интернализации двуцепочечного ДНК зонда *Alu* повтора в ГСК Sca1/c-Kit методом ПЦР в режиме реального времени. Расчет свидетельствует, что содержание ДНК зонда составляет ~14000 копий на клетку. **D** – электрофоретическая подвижность ПЦР-фрагмента, полученного с использованием праймеров M13 и матрицы ДНК, выделенной из ГСК мыши, индуцированной hDNA^{9r} и инкубированной с фрагментом *Alu* человека. Слева – продукты ПЦР с матриц «*Alu* в колониях» и ДНК мыши. Справа – электрофорез продуктов ПЦР в режиме реального времени из аналогичных матриц. Стрелки указывают продукты ПЦР, синтезированные с конкатамеризованной *Alu*/ДНК матрицы (Potter et al., 2024).

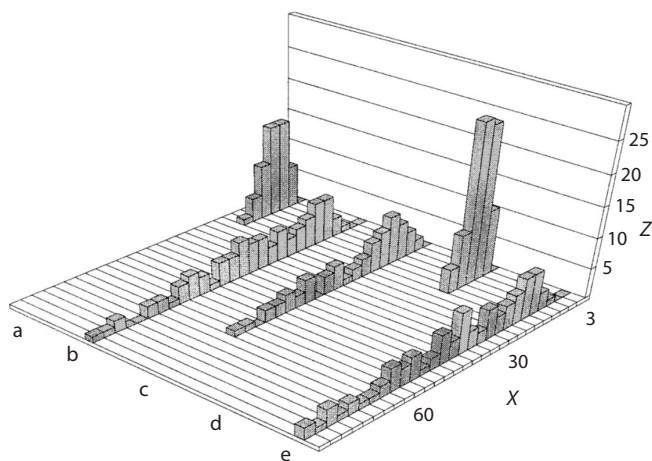


Рис. 3. Гистограмма распределения длины кометных хвостов ДНК ядер клеток ОТФ9-63 до и после культивирования в течение различного времени в присутствии ретиноевой кислоты.

X – длина кометных хвостов ДНК ядер (цена деления 3 мкм); Z – количество клеток; а – недифференцированные клетки; б–д – дифференцировка в течение 24, 36 и 96 ч соответственно; е – недифференцированные эмбриональные стволовые клетки, облученные рентгеновскими лучами в дозе 200 рад. Длина кометных хвостов среди экспонированных клеток включает размер ядра (Vatolin et al., 1997).

показанных в статье (Vatolin et al., 1997), в ГСК при коммитировании также индуцируются пангеномные одноцепочечные разрывы и, как следствие, развивается «рекомбиногенная ситуация» (Лихачева и др., 2008). В этот момент доставленные во внутренние компартменты стволовых клеток экстраклеточные фрагменты ДНК становятся естественными участниками рекомбинационных процессов, которые связаны с появлением и репарацией указанных одноцепочечных разрывов.

Было сделано предположение, что во время «рекомбиногенной ситуации», развившейся в ГСК, возможны различные репарационно-рекомбинационные события между находящимися внутри клетки захваченными экстраклеточными фрагментами ДНК, которые сами индуцировали возникновение одноцепочечных разрывов и «рекомбиногенную ситуацию», и ДНК хромосом. В результате указанных репарационно-рекомбинационных событий происходит опосредованное естественными молекулярными процессами изменение определенных хромосомных локусов, попавших в зону протекающих репаративных процессов вследствие гомологичного обмена или интеграции добавочного хроматина, например, в центромерные или теломерные агломераты. Возможно появление транзитных интермедиатов репарации. Завершением таких событий может быть: 1) интеграция экстраклеточных фрагментов в реципиентный геном; 2) реконструктивное замещение гомологичных геномных локусов; 3) появление не интегрированных в геном транзитных интермедиатов репарации. Возникшие при этом молекулярные изменения будут проявляться на уровне клеток, тканей, органов, функциональных систем и организма в целом.

Предполагается, что возможность негомологичного встраивания экстраклеточных фрагментов маловероятна

в связи с отсутствием молекулярной основы такой интеграции, а именно нефункциональных двуцепочечных разрывов. Возможность фиксации в геноме негомологичной экстраклеточной ДНК может быть связана с «несовершенством» механизма однонитевого отжига и участием микрогомологий в указанном процессе.

Концепция природной реконструкции генома

Экстраклеточные фрагменты дцДНК захватываются и интернализируются во внутренние компартменты ГСК естественным природным механизмом. Указанный субстрат (экстраклеточные фрагменты дцДНК) «предлагается» стволовой клетке в качестве экстраклеточного материала или в условиях *in vivo*, *ex vivo* или *in situ*. Доставленные во внутренние клеточные компартменты фрагменты дцДНК индуцируют терминальную дифференцировку кроветворных стволовых клеток, одним из маркеров которой является возникновение пангеномных одноцепочечных разрывов, с которыми экстраклеточные фрагменты внутриклеточной локализации приходят в молекулярное взаимодействие. Пангеномные одноцепочечные разрывы переводят определенный уровень компактизации хроматина ядра в релаксированную форму, что создает условия для последующей его реорганизации. В таком состоянии хроматин проходит митоз. В результате первого деления в одной дочерней клетке восстанавливается трехмерная архитектура хроматина исходной клетки со стволовыми характеристиками. Во второй дочерней клетке происходит реорганизация хроматина (репрограммирование) и создается новая трехмерная архитектура в выбранном направлении дифференцировки клетки с учетом новых торсионных напряжений, определяющих новую 3D структуру хроматина. В момент появления и репарации пангеномных одноцепочечных разрывов в ГСК индуцируется «рекомбиногенная ситуация» и создаются условия для интеграции доставленных внутрь клетки фрагментов в ДНК хроматина. При этом может происходить: 1) замещение гомологичных участков; 2) прямая интеграция в гомологичные или негомологичные районы генома экстраклеточных фрагментов; 3) образование транзитных интермедиатов. Выбор пути и механизм интеграции неизвестны, но предполагается в первую очередь гомологичный обмен между внешней матрицей и ДНК генома. ГСК, в которых произошло «нелегитимное» встраивание экстраклеточной негомологичной ДНК, элиминируются из популяции ГСК. Принципиальные механистические схемы обозначенных процессов представлены в тематических экспериментальных частях настоящего цикла работ.

Заключение

Предлагаемая концепция доказывается в серии экспериментальных исследований, объединенных в цикл работ под общим названием «Концепция природной реконструкции генома». В последующих статьях цикла будут рассмотрены вопросы, характеризующие начальные события взаимодействия ГСК с экстраклеточными фрагментами дцДНК, и последствия этого взаимодействия, приводящие к изменению как структурной и линейной организации экстраклеточных фрагментов дцДНК, так

и функционального состояния таргетных гемопоэтических предшественников (ГСК). Будут проанализированы изменения в геноме, связанные с появлением во внутриклеточном пространстве стволовых клеток крови экстраклеточных фрагментов дцДНК. В витальных тестах будет оценено влияние изменений в геноме ГСК, произошедших в результате взаимодействия с фрагментами экстраклеточной дцДНК, на некоторые биологические параметры экспериментальных животных (изменение продолжительности жизни). И наконец, в кейсовом клиническом исследовании будет проанализирован плеiotропный эффект воздействия экстраклеточной дцДНК на ГСК человека с акцентом на смену статуса гемопоэза (олигоклональный/нормальный).

Список литературы / References

- Ерохин В.Е., Кузнецов А.В. Информационная и регуляторная роль растворенного в морской воде органического вещества. *Мор. экол. журн.* 2009;8(2):64-69
- [Erokhin V.E., Kuznetsov A.V. Informative and regulatory roles of dissolved organic matter in seawater. *Morskoi Ekologicheskii Zhurnal = Marine Ecol. J.* 2009;8(2):64-69 (in Russian)]
- Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Шилов А.Г., Себелева Т.Е., Струнkin Д.Н., Черных Е.Р., Гельфгат Е.Л., Богачев С.С., Шурдов М.А. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке. *Информ. вестн. ВООГ.С.* 2008;12(3):426-473
- [Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gel'fgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2008;12(3):426-473 (in Russian)]
- Almqvist N., Winkler T.H., Mårtensson I.L. Autoantibodies: focus on anti-DNA antibodies. *Self/Nonself.* 2011;2(1):11-18. DOI 10.4161/SELF.2.1.15087
- Andersson J.O. Lateral gene transfer in eukaryotes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005;62(11):1182-1197. DOI 10.1007/S00018-005-4539-Z
- Anker P., Mulcahy H., Chen X.Q., Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65-73. DOI 10.1023/a:1006260319913
- Arnalich F., Maldifassi M.C., Ciria E., Quesada A., Codoceo R., Heruzo R., Garcia-Cerrada C., Montoya F., Vazquez J.J., López-Colazo E., Montiel C. Association of cell-free plasma DNA with perioperative mortality in patients with suspected acute mesenteric ischemia. *Clin. Chim. Acta.* 2010;411(17-18):1269-1274. DOI 10.1016/j.cca.2010.05.017
- Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y.J., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* 2011;2:180. DOI 10.1038/ncomms1180
- Barbalat R., Ewald S.E., Mouchess M.L., Barton G.M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29(1):185-214. DOI 10.1146/annurev-immunol-031210-101340
- Barber G.N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.* 2011a;243(1):99-108. DOI 10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x
- Barber G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr. Opin. Immunol.* 2011b;23(1):10-20. DOI 10.1016/j.coi.2010.12.015
- Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M.J., Spetz A.L., Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(11):6407-6411. DOI 10.1073/PNAS.101129998
- Bianchi D.W., Dennis Lo Y.M. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann. NY Acad. Sci.* 2001;945:119-131. DOI 10.1111/J.1749-6632.2001.TB03872.X
- Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines.* 2011;10(4):499-511. DOI 10.1586/erv.10.174
- Cai J., Han Y., Ren H., Chen C., He D., Zhou L., Eisner G.M., Asico L.D., Jose P.A., Zeng C. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J. Mol. Cell Biol.* 2013;5(4):227-238. DOI 10.1093/JMCB/MJT011
- Camussi G., Deregibus M.C., Bruno S., Cantaluppi V., Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010;78(9):838-848. DOI 10.1038/KI.2010.278
- Castellheim A., Brekke O.L., Espevik T., Harboe M., Mollnes T.E. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand. J. Immunol.* 2009;69(6):479-491. DOI 10.1111/j.1365-3083.2009.02255.x
- Choubey D. DNA-responsive inflammasomes and their regulators in autoimmunity. *Clin. Immunol.* 2012;142(3):223-231. DOI 10.1016/j.clim.2011.12.007
- Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51. DOI 10.1016/J.TCB.2008.11.003
- Dolgova E.V., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Alyamkina E.A., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Prokopenko A.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Zagrebelnyi S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. "Delayed death" phenomenon: a synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA. *Gene.* 2012;495(2):134-145. DOI 10.1016/j.gene.2011.12.032
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romashchenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854
- Dolgova E.V., Shevela E.Y., Tyrinova T.V., Minkevich A.M., Proskurina A.S., Potter E.A., Orishchenko K.E., Zavyalov E.L., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Pronkina N.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Nonadherent spheres with multiple myeloma surface markers contain cells that contribute to sphere formation and are capable of internalizing extracellular double-stranded DNA. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016;16(10):563-576. DOI 10.1016/j.clml.2016.06.014
- Dolgova E.V., Petrova D.D., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kisaretova P.E., Potter E.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Karamysheva T.V., Romanenko M.V., Netesov S.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of the xenograft and its ascendant sphere-forming cell line as belonging to EBV-induced lymphoma, and characterization of the status of sphere-forming cells. *Cancer Cell Int.* 2019;19(1):120. DOI 10.1186/s12935-019-0842-x
- Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Egolina N.A., Efremova L.V., Veiko N.N. Oxidative stress as a significant factor for development of an adaptive response in irradiated and nonirradiated human lymphocytes after inducing the bystander effect by low-dose X-radiation. *Mutat. Res.* 2009;669(1-2):155-161. DOI 10.1016/j.mrfmmm.2009.06.005
- Farzaneh F., Zalin R., Brill D., Shall S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation. *Nature.* 1982;300(5890):362-366. DOI 10.1038/300362A0
- García-Olmo D.C., Picazo M.G., García-Olmo D. Transformation of non-tumor host cells during tumor progression: theories and evidence. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012;12(Suppl.1):S199-207. DOI 10.1517/14712598.2012.681370

- Guiducci C., Gong M., Xu Z., Gill M., Chaussabel D., Meeker T., Chan J.H., Wright T., Punaro M., Bolland S., Soumelis V., Banchereau J., Coffman R.L., Pascual V., Barrat F.J. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*. 2010;465(7300):937-941. DOI 10.1038/nature09102
- Hohlweg U., Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol. Genet. Genomics*. 2001;265(2):225-233. DOI 10.1007/S004380100450
- Holmgren L., Bergsmedh A., Spetz A.L. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Vox Sang.* 2002;83(Suppl.1):305-306. DOI 10.1111/1.1423-0410.2002.TB05323.X
- Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291-295. DOI 10.1126/science.1183021
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659-1665. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245480>
- Johnstone A.P., Williams G.T. Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes. *Nature*. 1982;300(5890):368-370. DOI 10.1038/300368A0
- Kaczorowski D.J., Scott M.J., Pibris J.P., Afrazi A., Nakao A., Edmonds R.D., Kim S., Kwak J.H., Liu Y., Fan J., Billiar T.R. Mammalian DNA is an endogenous danger signal that stimulates local synthesis and release of complement factor B. *Mol. Med.* 2012;18(1):851-860. DOI 10.2119/molmed.2012.00011
- Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Rev. Immunol.* 2002;20(1):709-760. DOI 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
- Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Yu., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004;23(6-7):879-883. DOI 10.1081/NCN-200026035
- Ledoux L. Uptake of DNA by living cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1965;4:231-267. DOI 10.1016/S0079-6603(08)60790-4
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dubatolova T.D., Strunkin D.N., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Erofeev I.S., Bogachev S.S., Yakubov L.A., Shurdov M.A. Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA. *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007;11(2):185-202
- Ludwig A.K., Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44(1):11-15. DOI 10.1016/j.biocel.2011.10.005
- MacDougall C.A., Byun T.S., Van C., Yee M.C., Cimprich K.A. The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev.* 2007;21(8):898-903. DOI 10.1101/gad.1522607
- Medzhitov R., Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 2000;173(1):89-97. DOI 10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x
- Palka-Santini M., Schwarz-Herzke B., Hösel M., Renz D., Auerbach S., Brondke H., Doerfler W. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol. Genet. Genomics*. 2003;270(3):201-215. DOI 10.1007/S00438-003-0907-2
- Petrova D.D., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Potter E.A., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells (Part II: Surface molecules, which belongs to distinctive groups with particular functions, form a unique pattern characteristic of a certain type of tumor stem-like cells). *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(24):15800. DOI 10.3390/ijms232415800
- Pisetsky D.S., Ullal A.J. The blood nucleome in the pathogenesis of SLE. *Autoimmun. Rev.* 2010;10(1):35-37. DOI 10.1016/j.autrev.2010.07.007
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice. *Oncotarget*. 2016;7(10):11580-11594. DOI 10.18632/oncotarget.7311
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Minkevich A.M., Rozanov A.S., Peltek S.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Seledtsov I.A., Molodtsov V.V., Zavyalov E.L., Taranov O.S., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Gene expression profiling of tumor-initiating stem cells from mouse Krebs-2 carcinoma using a novel marker of poorly differentiated cells. *Oncotarget*. 2017;8(6):9425-9441. DOI 10.18632/oncotarget.14116
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Kirikovich S.S., Oshikhmina S.G., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bryukhovetskiy A.S., Grivtsova L.U., Kolchanov N.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2024;57:e13072. DOI 10.1590/1414-431X2024E13072
- Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 2013;200(4):373-383. DOI 10.1083/JCB.201211138
- Rashed M.H., Bayraktar E., Helal G.K., Abd-Ellah M.F., Amero P., Chavez-Reyes A., Rodriguez-Aguayo C. Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(3):538. DOI 10.3390/IJMS18030538
- Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006;20(9):1487-1495. DOI 10.1038/sj.leu.2404296
- Ritter G., Dolgova E.V., Petrova D.D., Efremov Y.R., Proskurina A.S., Potter E.A., Ruzanova V.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells (Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells). *Front. Genet.* 2022;13:954395. DOI 10.3389/fgene.2022.954395
- Ronquist G. Prostatomes are mediators of intercellular communication: from basic research to clinical implications. *J. Intern. Med.* 2012;271(4):400-413. DOI 10.1111/j.1365-2796.2011.02487.x
- Ruzanova V., Proskurina A., Efremov Y., Kirikovich S., Ritter G., Levites E., Dolgova E., Potter E., Babaeva O., Sidorov S., Taranov O., Ostanin A., Chernykh E., Bogachev S. Chronometric administration of cyclophosphamide and a double-stranded DNA-mix at interstrand crosslinks repair timing, called "Karanahan" therapy, is highly efficient in a weakly immunogenic Lewis carcinoma model. *Pathol. Oncol. Res.* 2022;28:1610180. DOI 10.3389/PORE.2022.1610180
- Sakamoto Y., Ochiya T., Yoshioka Y. Extracellular vesicles in the breast cancer brain metastasis: physiological functions and clinical applications. *Front. Hum. Neurosci.* 2023;17:1278501. DOI 10.3389/FNHUM.2023.1278501
- Saukkonen K., Lakkisto P., Varpula M., Varpula T., Voipio-Pulkki L.M., Pettilä V., Pulkki K. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive Care Med.* 2007;33(9):1624-1627. DOI 10.1007/s00134-007-0686-z
- Schubert R., Lettmann C., Doerfler W. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.* 1994;242(5):495-504. DOI 10.1007/BF00285273
- Schubert R., Renz D., Schmitz B., Doerfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver

- via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94(3):961-966. DOI 10.1073/PNAS.94.3.961
- Schubbert R., Hohlweg U., Renz D., Doerfler W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol. Gen. Genet.* 1998;259(6):569-576. DOI 10.1007/S004380050850
- Sharma S., Fitzgerald K.A. Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog.* 2011;7(4):e1001310. DOI 10.1371/JOURNAL.PPAT.1001310
- Sibbald S.J., Eme L., Archibald J.M., Roger A.J. Lateral gene transfer mechanisms and pan-genomes in eukaryotes. *Trends Parasitol.* 2020;36(11):927-941. DOI 10.1016/J.PT.2020.07.014
- Simons M., Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009;21(4):575-581. DOI 10.1016/j.ceb.2009.03.007
- Soucy S.M., Huang J., Gogarten J.P. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* 2015;16(8):472-482. DOI 10.1038/NRG3962
- Takeshita F., Ishii K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2008;20(4):383-388. DOI 10.1016/j.coi.2008.05.009
- Tetta C., Bruno S., Fonsato V., Deregibus M.C., Camussi G. The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis*. 2011;7(2):105-115. DOI 10.4161/org.7.2.15782
- Vatolin S.Y., Okhapkina E.V., Matveeva N.M., Shilov A.G., Baiborodin S.I., Philimonenko V.V., Zhdanova N.S., Serov O.L. Scheduled perturbation in DNA during in vitro differentiation of mouse embryo-derived cells. *Mol. Reprod. Dev.* 1997;47(1):1-10. DOI 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-R
- Xia J., Guo Z., Yang Z., Han H., Wang S., Xu H., Yang X., Yang F., Wu Q., Xie W., Zhou X., Dermauw W., Turlings T.C.J., Zhang Y. Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins. *Cell*. 2021;184(7):1693-1705.e17. DOI 10.1016/J.CELL.2021.02.014
- Yakubov L., Rogachev V., Likhacheva A., Bogachev S., Sebeleva T., Shilov A., Baiborodin S., Petrova N., Mechetina L., Shurdov M., Wickstrom E. Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments. *Cell Cycle*. 2007;6(18):2293-2301. DOI 10.4161/cc.6.18.4729
- Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response. *Genes Dev.* 2007;21(8):879-885. DOI 10.1101/gad.1550307

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.


Поступила в редакцию 13.06.2024. После доработки 21.08.2024. Принята к публикации 05.09.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-79

Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика *Micractinium thermotolerans* и *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) из пирокластических отложений полуострова Камчатка (Россия)

Р.З. Сущенко , В.Ю. Никулин , В.Б. Багмет , А.Ю. Никулин 

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

 allaguvatova@yandex.ru

Аннотация. В ходе исследования разнообразия водорослей пирокластических отложений вулканов Шивелуч и Горелый (полуостров Камчатка) были выделены *Chlorella*-подобные штаммы зеленых водорослей VCA-72 и VCA-93 из проб, отобранных вдоль русла р. Байдарная на вулкане Шивелуч и на выходе термальных паров по краю кальдеры на южном склоне вулкана Горелый в 2018 и 2020 гг. соответственно. Идентификация штаммов выполнялась в рамках комплексного подхода микроскопическими и молекулярно-генетическими методами, включающими предварительную идентификацию, получение нуклеотидных последовательностей малой субъединицы и внутреннего транскрибируемого спейсера рРНК, построение филогенетических деревьев и вторичных структур участков ITS1 и ITS2 рРНК. На филогенетическом древе штамм VCA-93 кластеризовался в видовой кладе *Micractinium thermotolerans*. При сравнении моделей спиральных доменов ITS1 и ITS2 у *M. thermotolerans* различий не выявлено. Штамм VCA-72 занимал базальное положение в кладе *M. inermum*. Модели вторичной структуры спиралей штамма VCA-72 в целом были сходны с моделями для *M. inermum*, однако отмечена внутривидовая вариабельность, обусловленная в основном заменами в верхушечных и боковых петлях. В спиральных участках исследуемых штаммов *M. inermum* обнаружено пять замен hCBC, тогда как замен CBC обнаружено не было. Детальный анализ морфологии и жизненного цикла позволил выявить в стареющих культурах клетки, которые по размеру значительно превышают вегетативные и имеют грушевидную, овальную и эллипсоидную формы с неглубоким широким сужением в центре. Также в стареющих культурах обоих видов были выявлены клетки с бесцветными липидными каплями. Способность синтезировать и накапливать липиды говорит о большом потенциале штаммов для производства биодизельного топлива. Обзор местообитаний предыдущих и новых находок позволяет сделать вывод об экологической пластичности исследуемых видов. Полученные результаты дополняют сведения о биогеографии видов: *M. inermum* обнаружен впервые на территории России, а *M. thermotolerans* – на полуострове Камчатка.

Ключевые слова: микроводоросли; флористические находки; комплексный подход; морфология; филогения; вторичная структура ITS рРНК.

Для цитирования: Сущенко Р.З., Никулин В.Ю., Багмет В.Б., Никулин А.Ю. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика *Micractinium thermotolerans* и *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) из пирокластических отложений полуострова Камчатка (Россия). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(7):706-715. DOI 10.18699/vjgb-24-79


Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012400285-7).

Благодарности. Авторы выражают признательность коллегам из ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток: С.Ю. Гришину – за предоставленные пробы с вулкана Шивелуч, А.А. Гончарову – за ценные замечания при подготовке рукописи.

Molecular genetic and morphological characteristics of *Micractinium thermotolerans* and *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula (Russia)

R.Z. Sushchenko , V.Yu. Nikulin , V.B. Bagmet , A.Yu. Nikulin 

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

 allaguvatova@yandex.ru

Abstract. During the study of algal diversity in pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula, *Chlorella*-like green algae strains VCA-72 and VCA-93 were isolated from samples collected from along the Baydarnaya river bed on the Shiveluch volcano in 2018 and at the outlet of thermal vapors along the edge of the caldera on the southern slope of the Gorely volcano in 2020. Identification of the strains was carried out within the framework of an integrative approach using microscopic and molecular genetic methods, including preliminary taxon identification, obtaining nucleotide sequences of the small subunit and the internal transcribed spacer rRNA, reconstruction of phylogenetic trees and secondary structures of the ITS1 and ITS2 rRNA regions. On the phylogenetic tree, strain VCA-93 was clustered in the *Micractinium thermotolerans* species clade. No differences were found when comparing the helical domain models of ITS1 and ITS2 in *M. thermotolerans*. Strain VCA-72 occupied a basal position in the *M. inermum* clade. The secondary structure patterns of the helices of strain VCA-72 were generally similar to those of *M. inermum*, but intraspecific variability was noted, mainly due to substitutions in the apical and lateral loops. Five hCBC substitutions were found in the helical regions of the studied *M. inermum* strains, while no CBC substitutions were found. A detailed analysis of morphology and life cycle allowed us to identify the characteristics of the cells in aging cultures: their size was significantly higher than in vegetative ones and they were pear-shaped, oval, and ellipsoidal with a shallow, wide constriction in the center. In addition, cells with colorless lipid droplets were detected in aging cultures of both species. The ability to synthesize and accumulate lipids indicates the great potential of the strains for the production of biodiesel fuel. A review of the habitats of previous and new findings allowed us to note the ecological plasticity of the studied species. The results obtained complement the information on the biogeography of the species: this is the first record of *M. inermum* for the territory of Russia, and that of *M. thermotolerans*, for the Kamchatka Peninsula.

Key words: microalgae; floristic findings; integrative approach; morphology; phylogeny; secondary structure of ITS rRNA.

For citation: Sushchenko R.Z., Nikulin V.Yu., Bagmet V.B., Nikulin A.Yu. Molecular genetic and morphological characteristics of *Micractinium thermotolerans* and *M. inermum* (Trebouxiphyceae, Chlorophyta) from pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula (Russia). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7): 706-715. DOI 10.18699/vjgb-24-79

Введение

Род *Micractinium* Fresenius (Trebouxiphyceae, Chlorophyta) включает в себя *Chlorella*-подобные зеленые водоросли, среди которых встречаются симбиотические (*M. conductrix* (Brandt) Pröschold et Darienko, *M. tetrahymenae* Pröschold, Pitsch et Darienko) и свободноживущие организмы. В настоящее время в составе рода насчитывается 24 вида (Guiry M.D., Guiry G.M., 2024). Типовым видом является *M. pusillum* Fresenius, характеризующийся коккоидной организацией и образующий колонии из 2–4 клеток и щетинок (Fresenius, 1858). Предполагалось, что способность образовывать колонии и наличие щетинок – отличительные признаки вида (Komárek, Fott, 1983), однако было показано, что эти свойства проявлялись как защитный механизм только в ответ на совместное культивирование с коловраткой *Brachionus calyciflorus* Pallas, в отсутствие же альгофагов признаки не возникали (Luo et al., 2005, 2006). Кроме того, присутствие зоопланктона не всегда приводило к образованию щетинок и колоний у представителей *Micractinium* (Pröschold et al., 2011). Например, *M. conductrix*, *M. inermum* Hoshina et Fujiwara и другие виды рода не имеют щетинок и морфологически напоминают водоросли рода *Chlorella* (Pröschold et al., 2011; Hoshina, Fujiwara, 2013; Hong et al., 2015).

Гомопластичные признаки, приводящие к сходству между родами *Chlorella* и *Micractinium*, вызывают трудности при идентификации таксонов с использованием только морфологических данных. Применение комплексного подхода, объединяющего традиционные методы микроскопии и молекулярно-филогенетический анализ, позволяет различить не только таксоны, бедные на диагностические признаки, но и криптические виды (Komárek et al., 2014; Darienko, Pröschold, 2019).

Представители рода *Micractinium* являются известными объектами биотехнологических исследований. Ф. Кинтас-Нуньес с соавторами (Quintas-Nunes et al., 2023) по-

казали ростостимулирующее влияние экссудатов *Micractinium* sp. NFX-FRZ на растения томата, которое могло быть обусловлено фитогормонами, синтезированными водорослями. Выявлена способность *M. inermum* F014 очищать радиоактивные сточные воды (Kim et al., 2019). Л. Буараб с коллегами (Bouarab et al., 2004) обнаружили, что *M. pusillum* способен расти в миксотрофных условиях; это может обеспечить возможность для промышленного культивирования микроводорослей с достижением высокой плотности культуры. В ряде публикаций подтверждена пригодность *Micractinium* sp. для производства биотоплива (Abou-Shanab et al., 2014; Onay et al., 2014).

В ходе изучения разнообразия водорослей пирокластических отложений вулканов Шивелуч и Горелый (полуостров Камчатка) выделены *Chlorella*-подобные клональные культуры зеленых водорослей, которые были предварительно определены как виды рода *Micractinium*. Целью работы была видовая идентификация представителей рода *Micractinium* с помощью комплексного подхода.

Материалы и методы

Отбор проб, выделение штаммов, культивирование. Материалом для работы послужили *Chlorella*-подобные клональные культуры зеленых водорослей VCA-72 и VCA-93. Штамм VCA-72 был выделен из пробы пирокластических отложений, отобранной вдоль русла р. Байдарная на вулкане Шивелуч (56°33.98' N, 161°8.41' E) в 2018 г. Штамм VCA-93 выявлен из пробы, отобранной на выходе термальных паров по краю кальдеры на южном склоне вулкана Горелый (52°33.306' N, 158°01.742' E), где температура отложений составляла ~32 °C, в 2020 г. (рис. 1). На вулкане Горелый биотоп характеризовался отсутствием растительности, а при отборе проб наблюдалось таяние близлежащих снежников и испарение влаги. Отбор проб проводился с использованием классических микробиологических методов (Голлербах, Штина, 1969).

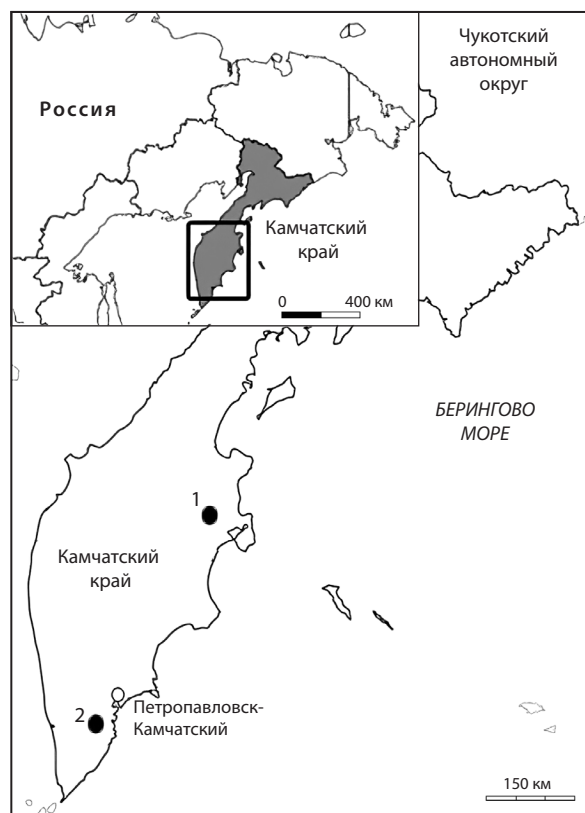


Рис. 1. Карта региона исследования и места отбора проб: 1 – вулкан Шивелуч, 2 – вулкан Горелый.

Для получения накопительных культур на чашки Петри со стерильной жидкой модифицированной средой Waris-H (McFadden, Melkonian, 1986; Andersen, 2005) (Приложение 1)¹ и жидкой модифицированной средой Болда с утроенным содержанием азота и добавлением витаминов (Starr, Zeikus, 1993; Schlösser, 1997; Andersen, 2005) (см. Приложение 1) помещали почвенную пробу массой не более 1 г и осуществляли культивирование. Накопительные культуры регулярно проверяли на рост водорослей с использованием инвертированного микроскопа Olympus CK30 (Olympus, Япония) с максимальным увеличением $\times 400$.

Чистые культуры выделяли микропипеточным способом (Andersen, 2005) и культивировали в модифицированной жидкой среде Waris-H. Культуры водорослей хранили при освещенности 117–120 люкс, температуре 24.9 °C, влажности 16 % и при чередовании световой и темновой фаз 16:8 ч.

Световая микроскопия, изучение морфологии. Морфологию водорослей исследовали с использованием микроскопа Olympus BX 53 (Olympus, Япония), с реализацией дифференциально-интерференционного контраста. Микрофотографии выполняли при помощи фотокамеры Olympus DP 27 (Olympus) при увеличении $\times 1000$. Для выявления границ варьирования морфологических признаков для каждого штамма были проанализированы параметры 50 вегетативных клеток.

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<https://vavilov-jcg.ru/download/pict-2024-28/appx24.pdf>

Молекулярно-генетический анализ. Идентификация штаммов выполнялась молекулярно-генетическими методами, включающими получение нуклеотидных последовательностей малой субъединицы и внутреннего транскрибируемого спейсера рРНК (18S+ITS рРНК; согласно протоколу (Nikulin et al., 2023)), построение филогенетических деревьев и вторичных структур участков ITS1 и ITS2 рРНК.

Для выделения ДНК клеточную биомассу отбирали во время экспоненциальной фазы роста и концентрировали центрифугированием. Общую геномную ДНК выделяли согласно методу Ц.С. Эхта с соавторами (Echt et al., 1992), с некоторыми модификациями (Abdullin et al., 2021). Амплификацию проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с набором Encyclo Plus («Евроген», Россия), праймерами 82F (5'-GA AACTGCGAATGGCTC-3') (López-García et al., 2003) и ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Параметры ПЦР: начальная денатурация при 96 °C в течение 3 мин, затем 30 циклов, включающих денатурацию при 96 °C – 1 мин, отжиг при 55 °C – 2 мин, элонгацию при 68 °C – 3 мин. Далее следовала финальная элонгация при 68 °C – 7 мин (Mikhailyuk et al., 2018).

Секвенирование производилось с помощью оборудования ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, США). Продукты ПЦР секвенировали в обоих направлениях с набором для секвенирования BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems) и теми же праймерами, которые использовались для ПЦР. Дополнительно применяли праймеры SSU528F-800 (5'-CGGTAATTCCAGCTCC-3') (Hoef-Emden, Melkonian, 2003), 920F (5'-GAAACTTAAAKGAATTG-3') (Marin et al., 1998), n1400R (5'-GGTAGGAGCGACGGGCGGTGTGTAC-3') (Marin et al., 2003) и Bd18SF1 (5'-TTTGTACA CACCGCCCGTCGC-3') (Goka et al., 2009). Последовательности собирали в пакете программ Staden v.1.4 (Bonfield et al., 1995) и сравнивали с другими штаммами, доступными в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI, США), с помощью поиска BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выбор репрезентативных последовательностей для филогенетического анализа осуществлялся на основании набора данных зеленых водорослей рода *Micractinium* (Krivina et al., 2023), который включал 48 последовательностей 18S+ITS рРНК (2418 выровненных позиций). В качестве внешней группы в набор данных добавлена последовательность таксона *Chlorella vulgaris* Beijerinck, представляющая филогенетически отдаленную линию. Последовательности выравнивались в программе SeaView (Galtier et al., 1996) с коррекцией выравнивания вручную. Наиболее подходящая модель нуклеотидных замен для нашего набора данных определялась на основе информационного критерия Акаике (AIC) (Akaike, 1974) в программе jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012).

Построение филогенетических деревьев осуществлялось методом максимального правдоподобия (ML) и байесовским подходом (BI). Анализ методом ML проводился с использованием сервера RAxML v. 7.7.1 (<http://embnet>).

vital-it.ch/raxml-bb/) (Kozlov et al., 2019), BI – программы MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). При BI анализе создавали 5 млн генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 100 генераций, т.е. 50000 проб. Первые 25 % проб (до выхода значений $-\ln L$ на плато) исключались из анализа как “burn-in”. Конвергенция Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) к стационарному распределению была оценена визуально с помощью программы Tracer 1.7.1 (Rambaut et al., 2018) по диаграмме апостериорных вероятностей. Все значения ESS были больше 200. Устойчивость узлов филогенетических деревьев, полученных методом ML, рассчитана с помощью сервера RAXML методом бутстрэпа (bootstrap percentage, BP) (Stamatakis et al., 2008) и определением апостериорных вероятностей (posterior probabilities, PP) в BI. Значения BP менее 50 % и PP менее 0.95 не рассматривались. Филогенетические деревья визуализировали с помощью программы FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2018).

Для подтверждения идентификации штаммов сравнивались вторичные структуры участков ITS1 и ITS2 рНК между филогенетически родственными (близкими) последовательностями. Построение вторичных структур осуществляли на основе моделей, разработанных для представителей рода *Micractinium* (Chae et al., 2019; Krivina et al., 2023), с помощью веб-сервера UNAFold (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>) (Zuker, 2003) и визуализировали в программе VARNA (Darty et al., 2009). Далее производили поиск компенсаторных и полукompенсаторных замен оснований (CBC, hCBC) (Cai-sová et al., 2013) и других молекулярных признаков, отличающих штаммы.

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ

Последовательности участка, включающего 18S–ITS1–5.8S–ITS2 рНК штаммов VCA-93 и VCA-72, депонированы в базу данных GenBank под номерами доступа PP501334 и PP501335 соответственно. BLAST-поиск позволил установить их высокое сходство с последовательностями *Micractinium* sp. (*M. thermotolerans*) (Krivina et al., 2023) ACSSI 332 MT784118 (99.91 %) и *M. inermum* NLP-F014 KF597304 (99.29 %).

На филогенетическом древе штамм VCA-93 кластеризовался в установленной только топологически видовой кладе *M. thermotolerans* со штаммами ACSSI 332 (голотип) и IC-76 (рис. 2). Все три штамма обнаружены на территории РФ: п-ов Камчатка, Чукотский полуостров (Krivina et al., 2023) и Западно-Сибирская равнина (Piligaev et al., 2018) соответственно. Родственной им является кллада с умеренной статистической поддержкой (73/0.98, BP/PP), включающая штаммы *Micractinium* sp. из Африки – TvB (выделенный из горячих источников Тивериады), SH (из карстовой воронки рядом с Эй-Геди), CCAP 211/92 (почвенная проба с Сейшельских островов).

Как отмечалось ранее, в отличие от «африканских» штаммов, для всех представителей *M. thermotolerans* характерно отсутствие интрона во второй четверти гена 18S (Krivina et al., 2023). Это справедливо и для штамма

VCA-93. Сестринским видом оказался *M. tetrahymenae* SAG 2587.

Штамм VCA-72 занимал базальное положение в умеренно поддержанной кладе *M. inermum* (81/0.98) (см. рис. 2). В сестринском положении к нему находилась кллада (89/0.99), составленная из близкородственных штаммов, обнаруженных в Северной Америке, Европе и Азии: HS26 (пустыня Сонора в Аризоне, США) (Ganuza et al., 2016), NLP-F014 (р. Накдонг, Южная Корея) (Park et al., 2015), KM114868 (Уэстон-Парк-Понд, Великобритания) (Smith et al., 2015) и NIES-2171 (Ботанический сад Сендай, Япония) (Hoshina, Fujiwara, 2013). Таким образом, географическая структурированность в кладе *M. inermum* отсутствовала. Наиболее близкими к кладе *M. inermum* оказались видовые клады *M. lacustre*, *M. variabile*, *M. simplicissimum* и один образец *M. singularis*.

Вторичные структуры ITS1 и ITS2 рНК

Вторичные структуры участков ITS1 и ITS2 изученных штаммов соответствовали общепринятым моделям, разработанным для эукариотических организмов, в частности зеленых водорослей (Coleman, 2000, 2015). Модели спиральных доменов ITS1 и ITS2 штамма VCA-93 и штаммов *M. thermotolerans* ACSSI 332 и IC-76 (Приложение 2) характеризовались отсутствием замен между собой.

Представленные модели вторичной структуры спиралей штамма VCA-72 в целом были сходны с моделями для *M. inermum* (рис. 3).

Спираль I в ITS1 и спирали I, II в ITS2 были мономорфны, однако во всех других спиральных ITS у сравниваемых штаммов *M. inermum* отмечена внутривидовая вариабельность. Несмотря на это, консервативность структуры обусловлена преимущественной локализацией замен в верхушечных либо боковых петлях и наличием hCBC, сохраняющих парность оснований. По числу нуклеотидных отличий участки ITS1 ожидаемо оказались менее консервативными по сравнению с ITS2 (десять отличий против четырех). Большинство замен нуклеотидов в обоих спейсерах (десять замен) отличали наш штамм от остальных четырех, однако встречались замены и делеции (четыре), характеризующие конкретные штаммы (см. рис. 3). В спиральных обнаружено пять замен hCBC (три hCBC в ITS1: U→C в поз. 12 и 34 спирали III, A→G в поз. 17 спирали IV; две hCBC в ITS2: C→U в поз. 29 спирали III, U→C в поз. 26 спирали IV), в то время как замен CBC обнаружено не было. Топология основания спирали IV ITS2 штамма KM114868 отличалась от остальных (см. рис. 3).

Согласно CBC-концепции вида (Wolf et al., 2013), отсутствие CBC в ITS2 свидетельствует о принадлежности сравниваемых штаммов к одному виду. Таким образом, на основании результатов филогенетического анализа и моделирования вторичных структур нами достоверно идентифицированы исследуемые штаммы: VCA-93 принадлежит виду *M. thermotolerans* Krivina, Sinetova, Savchenko, Degtyarev, Tebina et Temraleeva, а VCA-72 – к *M. inermum*. Исследованный генотип последнего, ввиду наличия уникальных нуклеотидных замен, позволил добавить новые данные в пул молекулярного разнообразия участка ITS рНК вида *M. inermum*.

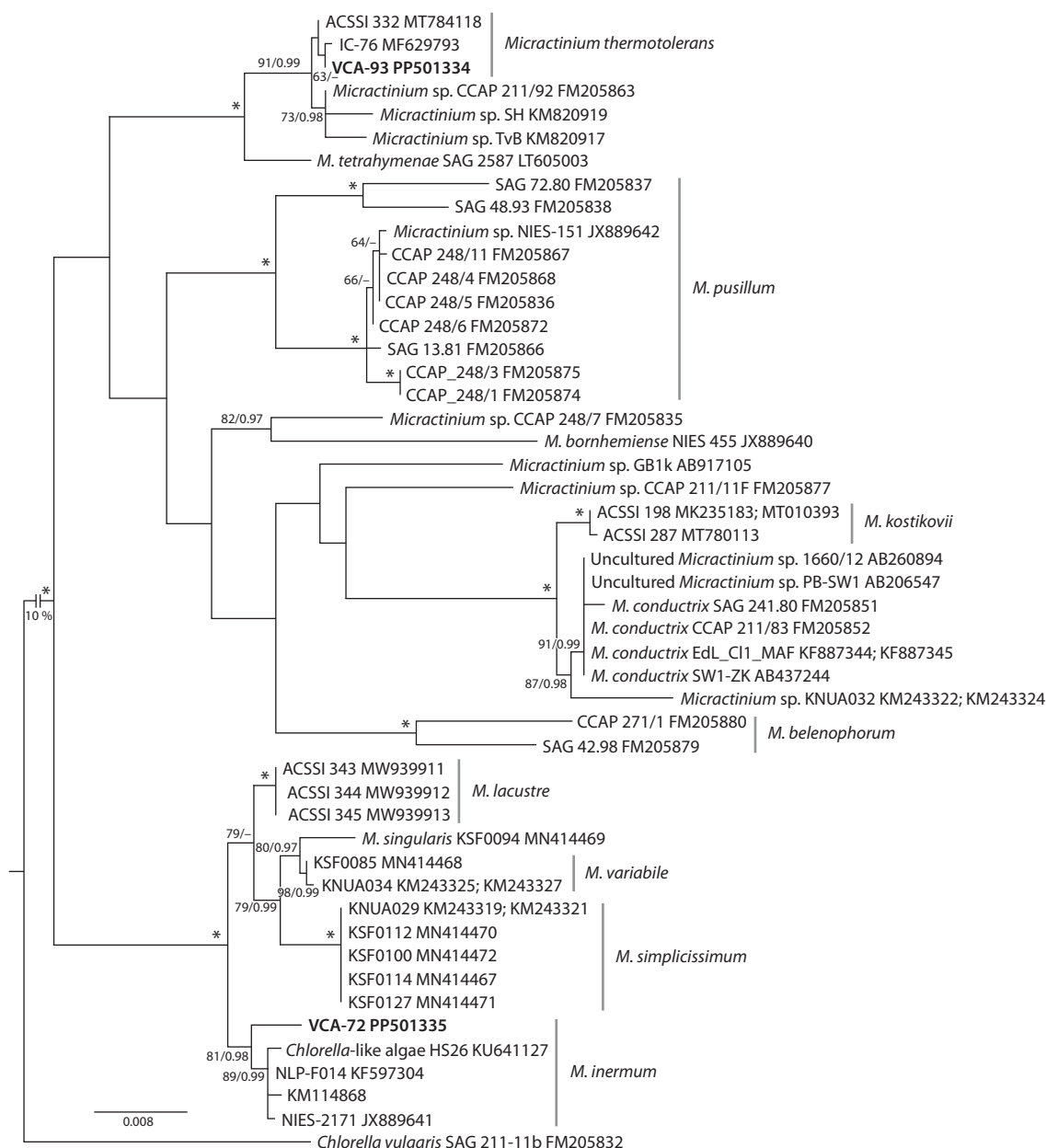


Рис. 2. ML-древу, иллюстрирующее филогенетическое положение штаммов VCA-93 и VCA-72 (выделены жирным шрифтом) среди представителей рода *Micractinium* на основании сравнения последовательностей 18S+ITS rDNA (2418 выровненных позиций; GTR+I+G модель).

Указаны поддержки узлов в анализах ML/BI (BP ≥ 50 % и PP ≥ 0.95). Узлы с максимальной поддержкой (100/1.00) обозначены звездочками. Ветвь, относящаяся к внешней группе, укорочена (показано только 10 % длины). Масштабная линейка – число нуклеотидных замен на позицию.

Морфология, размножение и экология

***Micractinium thermotolerans* Krivina, Sinetova, Savchenko, Degtyarev, Tebina et Temraleeva** (рис. 4, а–е). Клетки сферической формы, диаметром 3.2–6.5 мкм, без щетинок (см. рис. 4, а, б). Молодые клетки имеют треугольную, эллипсоидную (3.0–5.6 \times 3.3–5.9 мкм) или неправильную формы. Хлоропласт пристенный, чашевидный со сферическим пиреноидом, имеющим крахмальную обертку. Размножение 2–4 автоспорами (см. рис. 4, в–д). Размер спорангия 4.4–6.7 мкм в диаметре. Равноразмерные автоспоры треугольной или неправильной формы диаметром до 2 мкм освобождаются путем разрыва материнской

оболочки. Клеточные оболочки остаются заметными в культуре после высвобождения автоспор.

Клеточная стенка тонкая, в стареющих культурах заметно ее равномерное утолщение. В 6-месячных культурах встречаются грушевидные, овальные и эллипсоидные клетки с неглубоким широким сужением в центре, достигающие в длину 7.3–10.5 мкм (см. рис. 4, е).

Обнаружение клеток, значительно превышающих размеры зрелых вегетативных, согласуется с наблюдениями Е. Кривиной с коллегами (Krivina et al., 2023). Ими показано, что инкубация при повышенной нелетальной температуре приводит к появлению в культуре одиночных или

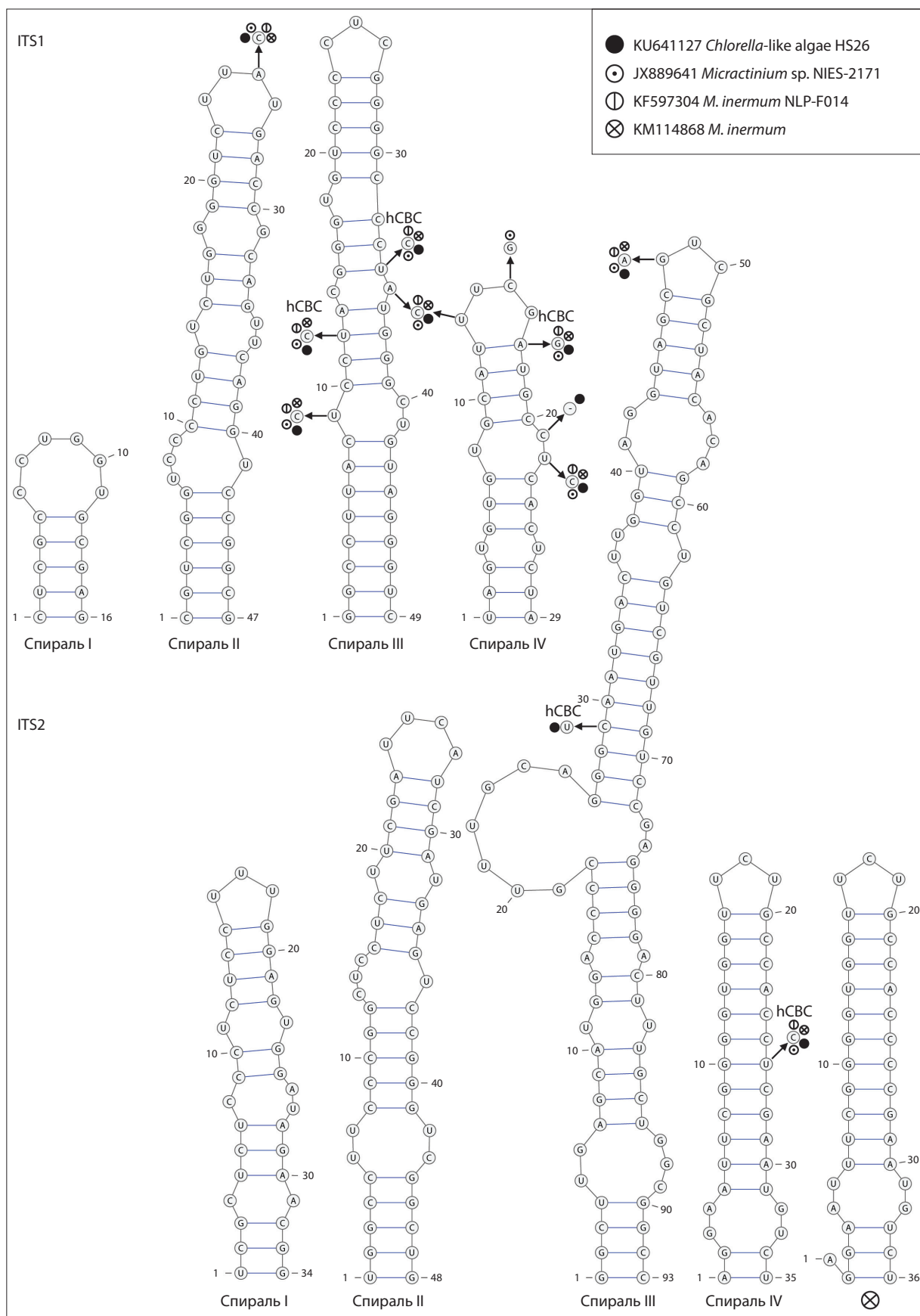


Рис. 3. Модели вторичной структуры спиральных доменов ITS1 и ITS2 штамма VCA-72.

Различия в нуклеотидных последовательностях со штаммами *M. inermum* HS26, NLP-F014, KM114868 и NIES-2171 указаны выносками в соответствии с легендой. Спираль IV ITS2 штамма KM114868 показана отдельно (справа внизу) ввиду топологических отличий.

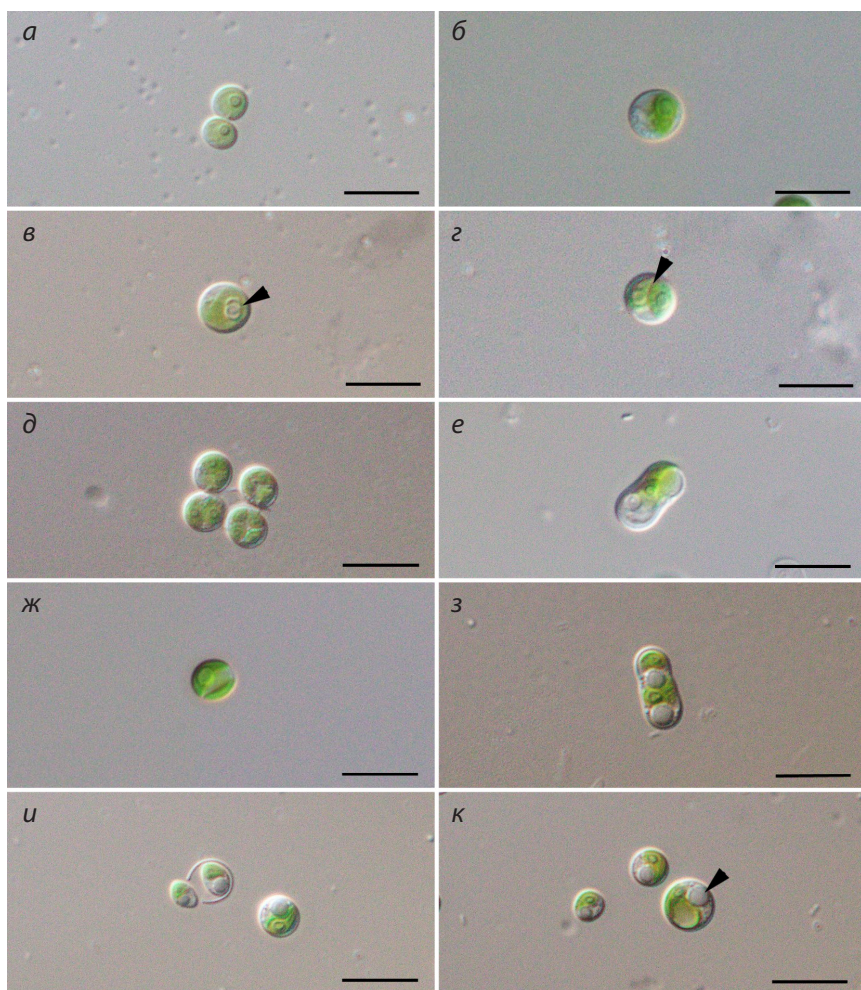


Рис. 4. Микрофотографии штаммов *M. thermotolerans* VCA-93 (а–е) и *M. inermum* VCA-72 (ж–к).

а, б – вегетативные клетки; в – преспорангиальная клетка (стрелкой показано удвоение пиреноида); г – преспорангиальная клетка (стрелкой показано удвоение протопласта); д – автоспорангии; е – эллипсоидная клетка с неглубоким широким сужением в центре с вакуолями; ж – вегетативная клетка; з – спорангий в стареющей культуре; и – высвобождение автоспор; к – клетка в стареющей культуре с липидной каплей и вакуолью (липидная капля указана стрелкой). Шкала 10 мкм.

аномально делящихся гигантских клеток диаметром 10.8–19.3 мкм. В нашем случае культивирование штамма *M. thermotolerans* VCA-93 осуществлялось при 24.9 °C, и, вероятно, по мере старения происходило истощение культуры, что способствовало появлению аномальных клеток с липидными каплями, сходных с данными по *M. thermotolerans* ACSSI 332 в условиях азотного голодания.

Для *M. thermotolerans* получены предварительные данные о составе жирных кислот (Krivina et al., 2023). Так, при описании вида был выявлен состав метиловых эфиров жирных кислот штамма ACSSI 332 (гексадекановая, 7,10,13-гексадекатриеновая, 9,12,15-октадекатриеновая, пентадекановая кислоты и др.), который отличался от жирнокислотного состава других видов рода *Micractinium* большей сложностью и разнообразием (Krivina et al., 2023). Авторами отмечен биотехнологический потенциал этого вида.

Два из трех известных штаммов *M. thermotolerans* были выделены из экстремальных местообитаний: VCA-93 – из тейфры, отобранной на выходе термальных паров по краю кальдеры вулкана Горелый (п-ов Камчатка), а ACSSI 332 – из горячего источника, расположенного на Чукотском полуострове (Krivina et al., 2023). При этом штамм IC-76 был выделен из речного песка с побережья р. Обь, Новосибирская область (Piligaev et al., 2018), что, возможно, свидетельствует об экологической пластичности вида.

Micractinium inermum Hoshina

et Fujiwara (см. рис. 4, ж–к). Одиночные клетки сферической (4.3–5.0 мкм) (см. рис. 4, жс), каплевидной или эллипсоидной формы (2.2–4.7 × 3.0–5.0 мкм), без щетинок. Хлоропласт одиночный, чашевидный, с выраженным пиреноидом. Бесполое размножение двумя автоспорами. Клетки в стареющих культурах сферические (5.7–7.9 мкм) или эллипсоидные, с неглубоким широким сужением в центре (см. рис. 4, з), достигают в длину 8.4–10.7 мкм и характеризуются наличием липидных капель соразмерно их величине (см. рис. 4, и, к).

В цитоплазме стареющих и покоящихся клеток происходит накопление в виде отдельных мелких или одной большой липидной капли, бесцветной или окрашенной в желтый, оранжевый, красный цвета (Андреева, 1998). Вероятно, цвет каплям липидов придают каротиноиды и их производные, которые накапливаются в липидных глобулах. Их можно обнаружить с помощью световой микроскопии в виде сферических цветных тел на стадиях покоя многих видов зеленых водорослей (Weiss, 1983). Например, для *Haematococcus pluvialis* Flotow было показано, что липидные капли имели красноватый цвет из-за присутствия жирорастворимого каротиноида – астаксантина (Ota et al., 2018). Согласно нашим наблюдениям, для стареющих клеток *M. inermum* VCA-72 характерно наличие бесцветных липидных капель (см. рис. 4, з–к).

Обнаружение липидных капель в клетках является также признаком истощения культуры, в том числе азотного голодания. Так, в работе (Zhan et al., 2016) отмечены значительные изменения в содержании липидов у *Chlorella* sp. в условиях обеднения культуры азотом. Дефицит питательных веществ наряду с такими факторами, как высокая интенсивность освещения и высокая концентрация солей, считается стрессовым фактором окружающей среды и вызывает накопление липидов или углеводов (Ho et al., 2012; Fernandes et al., 2013; Roleda et al., 2013; Park et al., 2015).

Известно, что исследуемые нами виды *Micractinium* характеризуются высокими темпами роста и способ-

ностью синтезировать и накапливать липиды (Park et al., 2015; Shi et al., 2019; Krivina et al., 2023). Данный аспект свидетельствует об их большом потенциале для производства биодизельного топлива (Wijffels, Barbosa, 2010). Имеется ряд работ, посвященных выявлению оптимальных условий культивирования *M. inermum*, позволяющих увеличивать его биологическую продуктивность и снижать расходы на поддержание культур. Так, показано, что максимальная продуктивность синтеза липидов штамма JL1 достигается при добавлении глюкозы в гетеротрофную культуру (Shi et al., 2019). При производстве биодизеля большое значение имеет профиль жирных кислот водорослей, поскольку он определяет ключевые свойства топлива (Knothe, 2009). Например, чем выше процентное содержание олеиновой кислоты, тем выше оценивается качество топлива (Knothe, 2009). А. Банскота с соавторами (Banskota et al., 2024) в биомассе *M. inermum* выявили олеиновую, линолевую и пальмитиновую кислоты.

С. Парк с коллегами (Park et al., 2015) предложили культивировать *M. inermum* NLP-F014 в среде из смеси сточных вод. В их эксперименте содержание липидов достигло 40 % в условиях истощения культуры. Данный способ позволяет снизить потребности в воде и питательных веществах, а значит, и затраты на культивирование. Авторы другого исследования (Sydney et al., 2018) обрабатывали культуру *M. inermum* ультрафиолетом В (UVB) для уменьшения энергозатрат, требующихся для разрушения клеточной стенки и экстракции липидов, что способствовало увеличению выхода метиловых эфиров жирных кислот. Таким образом, штаммы этого вида являются кандидатами для производства биотоплива.

В большинстве публикаций (Park et al., 2015; Smith et al., 2015; Dickinson et al., 2019; Shi et al., 2019; Banskota et al., 2024) указаны пресноводные местообитания *M. inermum*. Мелкие размеры и быстрые темпы воспроизводства, вероятно, позволяют представителям этого вида не только вести планктонный образ жизни в водоемах, но и выживать в наземных местообитаниях, в том числе в таких экстремальных биотопах, как вулканические отложения Камчатки (пирокластические отложения вдоль русла р. Байдарная на вулкане Шивелуч).

Заключение

В результате исследования разнообразия водорослей пирокластических отложений вулканов Шивелуч и Горелый (п-ов Камчатка) с помощью комплексного подхода были выявлены представители рода *Micractinium*. Полученные данные дополняют сведения о вторичной структуре участков ITS1 и ITS2 рПНК, морфологии (морфология клеток в стареющих культурах *M. inermum* и *M. thermotolerans*), жизненном цикле (более подробно рассмотрен жизненный цикл *M. inermum*), экологии (виды входят в число первичных колонизаторов безжизненного субстрата на п-ове Камчатка; жизнедеятельность *M. thermotolerans* при температуре отложений ~32 °C) и биогеографии (*M. inermum* впервые отмечен на территории России, а *M. thermotolerans* является первой находкой для п-ова Камчатка) обнаруженных видов.

Список литературы / References

- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998
- [Andreyeva V.M. Soil and Aerophilic Green Algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). St. Petersburg: Nauka Publ., 1998 (in Russian)]
- Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Л.: Наука, 1969
- [Gollerbah M.M., Shtina E.A. Soil Algae. St. Petersburg: Nauka Publ., 1969 (in Russian)]
- Abdullin Sh.R., Nikulin A.Yu., Bagmet V.B., Nikulin V.Yu., Goncharov A.A. New cyanobacterium *Aliterella vladivostokensis* sp. nov. (Aliterellaceae, Chroococcidiopsidales), isolated from temperate monsoon climate zone (Vladivostok, Russia). *Phytotaxa*. 2021;517: 221-233. DOI 10.11646/phytotaxa.527.3.7
- Abou-Shanab R.A.I., El-Dalatony M.M., El-Sheekh M.M. Cultivation of a new microalga, *Micractinium reisseri*, in municipal wastewater for nutrient removal, biomass, lipid, and fatty acid production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2014;19:510-518. DOI 10.1007/s12257-013-0485-z
- Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*. 1974;19:716-723. DOI 10.1109/TAC.1974.1100705
- Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. New York: Elsevier Acad. Press, 2005
- Banskota A.H., Hui J.P.M., Jones A., McGinn P.J. Characterization of neutral lipids of the oleaginous alga *Micractinium inermum*. *Molecules*. 2024;29:359. DOI 10.3390/molecules29020359
- Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(24):4992-4999. DOI 10.1093/nar/23.24.4992
- Bouarab L., Dauta A., Loudiki M. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Res.* 2004;38(11):2706-2712. DOI 10.1016/j.watres.2004.03.021
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*. 2013;164(4):482-496. DOI 10.1016/j.protis.2013.04.005
- Chae H., Lim S., Kim H.S., Choi H.G., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) taxa, including three new species from Antarctica. *Algae*. 2019;34(4):267-275. DOI 10.4490/algae.2019.34.10.15
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*. 2000;151(1):1-9. DOI 10.1078/1434-4610-00002
- Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 2015;31(3):157-163. DOI 10.1016/j.tig.2015.01.002
- Darienko T., Pröschold T. Reevaluation and discovery of new species of the rare genus *Watanabea* and establishment of *Massjukichlorella* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using an integrative approach. *J. Phycol.* 2019;55:493-499. DOI 10.1111/jpy.12830
- Darriba D., Taboada G., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012;9: 772. DOI 10.1038/nmeth.2109
- Darty K., Denise A., Ponty Y. VARN: interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*. 2009;25:1974-1975. DOI 10.1093/bioinformatics/btp250
- Dickinson K.E., Lalonde C.G., McGinn P.J. Effects of spectral light quality and carbon dioxide on the physiology of *Micractinium inermum*: growth, photosynthesis, and biochemical composition. *J. Appl. Phycol.* 2019;31:3385-3396. DOI 10.1007/s10811-019-01880-z
- Echt C.S., Erdahl L.A., McCoy T.J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome*. 1992;35(1):84-87. DOI 10.1139/g92-014

- Fernandes B., Teixeira J., Dragone G., Vicente A.A., Kawano S., Bišová K., Vítová M. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresour. Technol.* 2013;144:268-274. DOI 10.1016/j.biortech.2013.06.096
- Fresenius G. Beiträge zur Kenntniss mikroskopischer Organismen. *Abh. Senckenberg. Naturforsch. Ges.* 1858;2(2):211-242. DOI 10.5962/bhl.title.2137
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. Seaview and phylo-win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 1996;12:543-548. DOI 10.1093/bioinformatics/12.6.543
- Ganuza E., Sellers C.E., Bennett B.W., Carney L.T. A novel treatment protects *Chlorella* at commercial scale from the predatory bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Front. Microbiol.* 2016;7:188348. DOI 10.3389/fmicb.2016.00848
- Goka K., Yokoyama J., Une Y., Kuroki T., Suzuki K., Nakahara M., Kobayashi A., Inaba S., Mizutani T., Hyatt A.D. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol. Ecol.* 2009;18(23):4757-4774. DOI 10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. (Cited on April 15, 2024). Available from: <http://www.algaebase.org>
- Ho S.H., Chen C.Y., Chang J.S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 2012;113:244-252. DOI 10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Hoef-Emden K., Melkonian M. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist.* 2003;154:371-409. DOI 10.1078/143446103322454130
- Hong J.W., Jo S.-W., Cho H.-W., Nam S.W., Shin W., Park K.M., Lee K.I., Yoon H.-S. Phylogeny, morphology, and physiology of *Micractinium* strains isolated from shallow ephemeral freshwater in Antarctica. *Phycol. Res.* 2015;63:212-218. DOI 10.1111/pre.12097
- Hoshina R., Fujiwara Y. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2013;31:124-132. DOI 10.1111/pre.12010
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17:754-755. DOI 10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Kim I., Yang H.-M., Park C.W., Yoon I.-H., Seo B.-K., Kim E.-K., Ryu B.-G. Removal of radioactive cesium from an aqueous solution via bioaccumulation by microalgae and magnetic separation. *Sci. Rep.* 2019;9:10149. DOI 10.1038/s41598-019-46586-x
- Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci.* 2009;2:2759-2766. DOI 10.1039/B903941D
- Komárek J., Fott B. Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi G. (Ed.) Das Phytoplankton des Süßwassers. 7. Teil. 1. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1983;1-1044
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia.* 2014;86(4):295-335
- Kozlov A.M., Darriba D., Flouri T., Morel B., Stamatakis A. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics.* 2019;35:4453-4455. DOI 10.1093/bioinformatics/btz305
- Krivina E., Sinetova M., Savchenko T., Degtyaryov E., Tebina E., Temraleeva A. *Micractinium lacustre* and *M. thermotolerans* spp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): taxonomy, temperature-dependent growth, photosynthetic characteristics and fatty acid composition. *Algal Res.* 2023;71:103042. DOI 10.1016/j.algal.2023.103042
- López-García P., Philippe H., Gail F., Moreira D. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:697-702. DOI 10.1073/pnas.0235779100
- Luo W., Krienitz L., Pflugmacher S., Walz N. Genus and species concept in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Chlorellaceae): genotype versus phenotypic variability under ecosystem conditions. *SIL Proceedings.* 2005;29(1):170-173. DOI 10.1080/03680770.2005.11901988
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist.* 2006;157:315-333. DOI 10.1016/j.protis.2006.05.006
- Marin B., Klingberg M., Melkonian M. Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist.* 1998;149:265-276. DOI 10.1016/S1434-4610(98)70033-1
- Marin B., Palm A., Klingberg M., Melkonian M. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist.* 2003;154:99-145. DOI 10.1078/143446103764928521
- McFadden G.I., Melkonian M. Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. *Phycologia.* 1986;25:551-557. DOI 10.2216/i0031-8884-25-4-551.1
- Mikhailyuk T., Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. New taxa of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist.* 2018;169:406-431. DOI 10.1016/j.protis.2018.03.002
- Nikulin V.Yu., Nikulin A.Yu., Gontcharov A.A., Bagmet V.B., Abdullin Sh.R. *Oogamochlamys kurilensis* sp. nov. (Chlorophyta, Volvocales) from the soils of Iturup Island (Sakhalin Region, Russia). *Plants.* 2023;12:3350. DOI 10.3390/plants12193350
- Onay M., Sonmez C.A., Oktem H., Yücel M. Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia. *Bioresour. Technol.* 2014;169:62-71. DOI 10.1016/j.biortech.2014.06.078
- Ota S., Morita A., Ohnuki S., Hirata A., Sekida S., Okuda K., Ohya Y., Kawano S. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci. Rep.* 2018;8:5617. DOI 10.1038/s41598-018-23854-w
- Park S., Kim J., Yoon Y., Park Y., Lee T. Blending water-and nutrient-source wastewaters for cost-effective cultivation of high lipid content microalgal species *Micractinium inermum* NLP-F014. *Bioresour. Technol.* 2015;198:388-394. DOI 10.1016/j.biortech.2015.09.038
- Piligaev A.V., Sorokina K.N., Shashkov M.V., Parmon V.N. Screening and comparative metabolic profiling of high lipid content microalgal strains for application in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 2018;250:538-547. DOI 10.1016/j.biortech.2017.11.063
- Pröschold T., Darienko T., Silva P.C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of "Zoochlorella" revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 2011;13:350-364. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02333.x
- Quintas-Nunes F., Brandão P.R., Barreto Crespo M.T., Glick B.R., Nascimento F.X. Plant growth promotion, phytohormone production and genomics of the rhizosphere-associated microalga, *Micractinium rhizosphaerae* sp. nov. *Plants.* 2023;12:651. DOI 10.3390/plants12030651
- Rambaut A. *FigTree v.1.4.4*. 2018. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (Access date: 01.03.2024)
- Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 2018;67:901-904. DOI 10.1093/sysbio/syy032
- Roleda M.Y., Slocumbe S.P., Leakey R.J., Day J.G., Bell E.M., Stanley M.S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and

- lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour. Technol.* 2013; 129:439-449. DOI 10.1016/j.biortech.2012.11.043
- Schlösser U.G. Additions to the Culture collection of algae since 1994. *Bot. Acta.* 1997;110:424-429. DOI 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00659.x
- Shi M., Wei H., Chen Q., Wang X., Zhou W., Liu J. Exploring an isolate of the oleaginous alga *Micractinium inermum* for lipid production: molecular characterization and physiochemical analysis under multiple growth conditions. *J. Appl. Phycol.* 2019;31:1035-1046. DOI 10.1007/s10811-018-1653-5
- Smith R.T., Bangert K., Wilkinson S.J., Gilmour D.J. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass Bioenergy.* 2015;82:73-86. DOI 10.1016/j.biombioe.2015.04.023
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 2008;57:758-771. DOI 10.1080/10635150802429642
- Starr R.C., Zeikus J.A. UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. 1993 list of cultures. *J. Phycol.* 1993;29:1-106. DOI 10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x
- Sydney T., Marshall-Thompson J.-A., Kapoore R.V., Vaidyanathan S., Pandhal J., Fairclough J.P.A. The effect of high-intensity ultraviolet light to elicit microalgal cell lysis and enhance lipid extraction. *Metabolites.* 2018;8:65. DOI 10.3390/metabo8040065
- Weiss R.L. Fine structure of the snow alga (*Chlamydomonas nivalis*) and associated bacteria. *J. Phycol.* 1983;19:200-204. DOI 10.1111/j.0022-3646.1983.00200.x
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols – A Guide to Methods and Application. San Diego, CA, USA: Acad. Press, 1990;315-322
- Wijffels R.H., Barbosa M.J. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 2010;329:796-799. DOI 10.1126/science.1189003
- Wolf M., Chen S., Song J., Ankenbrand M., Müller T. Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences – a proof of concept. *PLoS One.* 2013;8(6):e66726. DOI 10.1371/journal.pone.0066726
- Zhan J., Hong Y., Hu H. Effects of nitrogen sources and C/N ratios on the lipid producing potential of *Chlorella* sp. HQ. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016;26:1290-1302. DOI 10.4014/jmb.1512.12074
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406-3415. DOI 10.1093/nar/gkg595

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.04.2024. После доработки 04.06.2024. Принята к публикации 13.06.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-80

Цитогенетические особенности межродовых амфидиплоидов и геномно-замещенных форм пшеницы

Е.Д. Бадаева ¹, Р.О. Давоян ², Н.А. Терещенко ¹, Е.В. Лялина ¹, С.А. Зошук ³, Н.П. Гончаров⁴

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

² Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 katerinabadaeva@gmail.com

Аннотация. Синтетические межродовые гибриды (амфидиплоиды) и геномно-замещенные формы пшеницы – важный источник для переноса хозяйственно ценных генов от диких видов в геном *Triticum aestivum* L. Их используют как для решения теоретических задач, так и в практических целях для получения дополненных или замещенных линий, а также для индукции пшенично-чужеродных транслокаций с помощью облучения или негомологичной конъюгации хромосом. Хромосомный и геномный состав аллополиплоидных форм обычно верифицируется в ранних гибридных поколениях, часто дальнейшая судьба этих гибридов остается неизученной. В настоящей работе с помощью методов С-дифференциального окрашивания хромосом по Гимза и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с ДНК-зондами pAs1 и pSc119.2 мы провели исследование кариотипов пяти гекса- ($2n = 6x = 42$) и октаплоидных ($2n = 8x = 56$) геномно-дополненных амфидиплоидов пшеницы с отдельными видами из родов *Aegilops*, *Haynaldia* и *Hordeum*, а также шести гексаплоидных пшенично-эгилопсных геномно-замещенных форм, полученных более 40 лет назад и поддерживаемых в коллекциях разных научно-исследовательских учреждений. Показано, что большинство исследованных форм цитогенетически стабильны, однако Авродес (геном BBAAASS) – гексаплоидный геномно-замещенный гибрид пшеницы и *Ae. speltoides*, расщеплялся по хромосомному составу после многих репродукций. Хромосомный анализ не подтвердил ожидаемого геномного состава геномно-замещенной форма Авротата, у которой вместо заявленного N-генома от *Ae. uniaristata* Vis. обнаружен D-геном. В данной работе показано, что октаплоидные формы проходят через более сложные преобразования геномов, чем гексаплоидные: в двух исследованных предположительно октаплоидных амфидиплоидах AD 7, AD 7147 произошла редукция числа хромосом до гексаплоидного уровня. У обеих форм были утрачены семь пар хромосом из разных родительских субгеномов, представляющих все семь гомеологических групп. В результате у них сформировался смешанный (гибридный) геном, состоящий из уникальной комбинации хромосом нескольких родительских субгеномов.

Ключевые слова: становление геномов; пшеница; амфидиплоиды; *Aegilops*; *Dasypyrum*; *Tritordeum*; геномно-дополненные формы; геномно-замещенные формы; кариотип; С-бэндинг; флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Для цитирования: Бадаева Е.Д., Давоян Р.О., Терещенко Н.А., Лялина Е.В., Зошук С.А., Гончаров Н.П. Цитогенетические особенности межродовых амфидиплоидов и геномно-замещенных форм пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):716-730. DOI 10.18699/vjgb-24-80

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № 122022600163-7.

Благодарности. Авторы выражают благодарность д-ру Andreas Börner (IPK, Гатерслебен, Германия) за предоставление образца AE 1491 для анализа и д-ру биол. наук И.Г. Лоскутову (ВИР, Санкт-Петербург, Россия) за предоставление образца тритордеума.

Cytogenetic features of intergeneric amphydiploids and genome-substituted forms of wheat

E.D. Badaeva ¹, R.O. Davoyan ², N.A. Tereshchenko ¹, E.V. Lyalina ¹, S.A. Zoshchuk ³, N.P. Goncharov⁴

¹ N.I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 katerinabadaeva@gmail.com

Abstract. Synthetic intergeneric amphydiploids and genome-substituted wheat forms are an important source for transferring agronomically valuable genes from wild species into the common wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. They can be used both in academic research and for breeding purposes as an original material for developing wheat-alien addition and substitution lines followed by translocation induction with the aid of irradiation or nonhomologous

chromosome pairing. The chromosome sets and genome constitutions of allopolyploids are usually verified in early hybrid generations, whereas the subsequent fate of these hybrids remains unknown in most cases. Here we analyze karyotypes of five hexa- ($2n = 6x = 42$) and octoploid ($2n = 8x = 56$) amphidybrids of wheat with several species of the *Aegilops*, *Haynaldia*, and *Hordeum* genera, and six genome-substituted wheat–*Aegilops* forms, which were developed over 40 years ago and have been maintained in different gene banks. The analyses involve C-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with pAs1 and pSc119.2 probes. We have found that most accessions are cytologically stable except for Avrotas (genome BBAASS, a hexaploid genome-substituted hybrid of wheat and *Aegilops speltoides*), which segregated with respect to chromosome composition after numerous reproductions. Chromosome analysis has not confirmed the presence of the N genome from *Ae. uniaristata* Vis. in the genome-substituted hybrid Avrotata. Instead, Avrotata carries the D genome. Our study shows that octoploid hybrids, namely AD 7, AD 7147 undergo more complex genome reorganizations as compared to hexaploids: the chromosome number of two presumably octoploid wheat–*Aegilops* hybrids were reduced to the hexaploid level. Genomes of both forms lost seven chromosome pairs, which represented seven homoeologous groups and derived from different parental subgenomes. Thus, each of the resulting hexaploids carries a synthetic/hybrid genome consisting of a unique combination of chromosomes belonging to different parental subgenomes.

Key words: genome stabilization; wheat; amphidybrid; *Aegilops*; *Dasyphyrum*; *Tritordeum*; genome-substituted forms; karyotype; C-banding; fluorescence *in situ* hybridization.

For citation: Badaeva E.D., Davoyan R.O., Tereshchenko N.A., Lyalina E.V., Zoshchuk S.A., Goncharov N.P. Cytogenetic features of intergeneric amphidybrids and genome-substituted forms of wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):716–730. DOI 10.18699/vjgb-24-80

Введение

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, по объему производства зерна занимающая третье место в мире после риса и кукурузы (Biodiversity, 2024). Предполагают, что она образовалась примерно 8–10 тыс. лет назад на северо-западе Ирана, в Прикаспийском регионе, в результате гибридизации тетраплоидной пшеницы и дикого злака *Aegilops tauschii* Coss. с последующим спонтанным удвоением хромосом (Kihara, 1975; Dvořák et al., 1998; Feldman, 2001; Feldman, Levy, 2023). Такие скрещивания могли происходить неоднократно и включать разные родительские генотипы пшеницы и эгилопса, произраставшие в том же районе (Hirotsawa et al., 2004; Luo et al., 2007). В свою очередь вновь образовавшиеся гексаплоидные пшеницы могли скрещиваться между собой и с другими видами по всему ареалу, расширяя и обогащая генофонд новой культуры (Feldman, 2001; Wang et al., 2013).

По сравнению с возделываемыми тетраплоидными видами мягкая пшеница более пластична (Dubcovsky, Dvořák, 2007), что дало ей лучшую приспособляемость при расселении на новые территории. Помимо этого, она обладает большей адаптивностью и более урожайна, характеризуется достаточно крупным зерном и легким обмоломом (Tadesse et al., 2016), а добавление генома D от *Ae. tauschii* обеспечило необходимые качества зерна для выпечки одного из самых главных продуктов питания человека – хлеба. Благодаря этим преимуществам мягкая пшеница быстро распространилась из своего центра происхождения на близлежащие территории, отсюда – в страны Европы, Азии и Африки, а позже в Южную и Северную Америку и Австралию, постепенно вытесняя пленчатые тетра- и гексаплоидные виды пшениц. Возделываемая человеком уже более 8 тыс. лет, она заняла обширные территории с различными почвенно-климатическими условиями.

В то же время за последнее столетие интенсивная селекция на продуктивность, базирующаяся на использовании ограниченного числа сортов-основателей, привела к

существенному обеднению генофонда мягкой пшеницы (Мартинов и др., 2006; Girma, 2017; Feldman, Levy, 2023). Задача расширения генофонда, поиска новых источников хозяйственно полезных признаков становится все более актуальной (Беспалова, 2015). Одними из наиболее перспективных доноров новых генов для улучшения пшеницы считаются ее дикие сородичи (wild crop relatives, WCR) (Prohens et al., 2017; Sharma M.P. et al., 2020; Sharma S. et al., 2021). Виды рода *Aegilops* L. – ближайшие родственники пшениц – обладают множеством ценных признаков, прежде всего устойчивостью к болезням и вредителям, засухоустойчивостью, высоким содержанием микроэлементов в зерне и рядом других, которые могут быть использованы в селекции пшеницы (Gill et al., 1986; Monneveux et al., 2000; Schneider et al., 2008; Molnár-Láng et al., 2015; Olivera et al., 2018; Kishii, 2019; Kumar et al., 2019). Успешному переносу генетического материала между представителями родов *Triticum* и *Aegilops* способствует их близкое филогенетическое родство, поскольку два из трех геномов мягкой пшеницы – В и D, а также ее плазмон были унаследованы от видов эгилопсов (Kihara, 1975; Tsunewaki, 1996).

Прямая передача генов от эгилопса в пшеницу представляет, тем не менее, непростую задачу. Для повышения эффективности переноса (интрогрессии) чужеродного генетического материала было разработано несколько стратегий, одна из которых подразумевает скрещивание пшеницы с целевым видом, удвоение числа хромосом у гибрида F_1 и получение на его основе дополненных и замещенных линий у мягкой и твердой пшениц, которые в дальнейшем можно использовать для индукции пшенично-чужеродных транслокаций (Peng et al., 2011; Zhang P. et al., 2015; Крупин и др., 2019; Kishii, 2019). Этот подход применялся, например, для получения дополненных и замещенных линий пшеницы с рожью (Gill, Kimber, 1974), ячменем (Islam, Shepherd, 1990; Cabrera et al., 1995; Molnár-Láng et al., 2000; Трубочеева и др., 2009), видами *Aegilops* (Friebe et al., 1992, 2000; Logojan, Molnár-Láng, 2000; Molnár-Láng et al., 2014), *Haynaldia villosa* (L.) Schur

(syn. *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy) (Minelli et al., 2005), *Thinopyrum* Á. Löve (syn. *Elytrigia* Desv.) (Schulz-Schaeffer, Friebe, 1992; Linc et al., 2012; Крупин и др., 2019) и другими злаками. В CIMMYT (Мехико, Мексика) было создано множество аллополиплоидных гибридов между разными видами тетраплоидной пшеницы и *Ae. tauschii* (Kishii, 2019; Aberkane et al., 2020). Согласно результатам анализа родословных, генетический материал эгилопсов, в основном *Ae. tauschii*, а также *Ae. umbellulata* Zhuk. и *Ae. ventricosa* Tausch, присутствует в более чем 1350 сортах и 9000 селекционных линий мягкой пшеницы (Мартынов и др., 2015), при этом их доля со временем только возрастает.

Помимо практического применения в селекции, синтетические аллополиплоиды активно использовались для исследования процессов, происходящих при образовании гибридных геномов (Özkan et al., 2001; Kashkush et al., 2002; Levy, Feldman, 2004), а полученные с их помощью дополненные и замещенные линии послужили ценным инструментом при установлении генетического родства (гомеологии) хромосом разных видов злаков (Dhaliwal et al., 1990; Cabrera et al., 1995; Friebe et al., 1995a, b, 2000; Badaeva et al., 2018). Следует отметить, что эти работы фокусировались преимущественно на исследовании процессов, происходящих на ранних этапах формирования аллополиплоидов, дальнейшая судьба которых, как правило, остается неизвестной.

Второй подход, предложенный д.б.н. Е.Г. Жировым, основан на получении геномно-замещенных форм мягкой пшеницы, D-геном которых заменен геномом одного из диплоидных *Aegilops* или других видов злаков (Жиров, Терновская, 1984; Давоян Р.О. и др., 2012). Для получения таких форм на первом этапе проводили экстракцию тетраплоидного ВВАА-компонента озимой мягкой пшеницы сорта Аврора. Этот тетракомпонент – тетраАврору – скрещивали с диплоидным видом *Aegilops*, геном

которого должен был заменить геном D мягкой пшеницы, а затем гибридные растения обрабатывали колхицином для удвоения числа хромосом и получения фертильных амфидиплоидов. Несмотря на то что некоторые геномно-замещенные формы, созданные Е.Г. Жировым, были цитологически исследованы и до настоящего времени востребованы селекционерами в качестве доноров генов устойчивости в селекции мягкой пшеницы и тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) (Давоян Р.О., Жиров, 1995; Давоян Э.Р. и др., 2012, 2023; Давоян Р.О. и др., 2019), большая часть таких гибридов методом дифференциального окрашивания хромосом охарактеризована не была.

Цель нашей работы – цитогенетическое изучение межродовых синтетических амфидиплоидов и геномно-замещенных форм мягкой пшеницы, полученных тридцать и более лет назад и поддерживаемых в генетических коллекциях разных организаций, с помощью С-метода дифференциального окрашивания хромосом и, в случае некоторых гибридов, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили следующие искусственно созданные геномно-замещенные формы и межродовые амфидиплоиды (см. таблицу).

Шесть геномно-замещенных форм созданы более сорока лет назад д.б.н. Е.Г. Жировым в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Подробное описание полученных форм приведено в диссертации Е.Г. Жирова «Геномы пшеницы (исследование и перестройка)» (Киев: Ин-т физиологии растений и генетики АН УССР, 1989). Два пшенично-эгилопсных геномно-дополненных амфидиплоиды созданы в Институте генетики и селекции АН АзССР, Баку, Г.Р. Пираловым (1976). Один был случайно обнаружен в коллекции Института культурных растений (IPK, Гатерслебен, Германия), его происхождение

Список исследованного материала

Название	Комбинация скрещивания	2n	Ожидаемый геномный состав	Генбанк
Авродес	<i>T. aestivum</i> × <i>Ae. speltoides</i>	42	BBAASS	НЦЗ
Аврозис	<i>T. aestivum</i> × <i>Ae. sharonensis</i>	42	BBAAS ^{sh} S ^{sh}	
Авролата	<i>T. aestivum</i> × <i>Ae. umbellulata</i>	42	BBAUUU	
Авротика	<i>T. aestivum</i> × <i>Ae. mutica</i>	42	BBAATT	ИЦИГ
Авродата*	<i>T. aestivum</i> × <i>Ae. caudata</i>	42	BBAACC	
Авротата*	<i>T. aestivum</i> × <i>Ae. uniaristata</i>	42	BBAANN	НЦЗ
AD 7*	<i>T. ispahanicum</i> × <i>Ae. cylindrica</i>	56	BBAAD ^c D ^c C ^c C ^c	ИЦИГ
AD 7147*	Амфидиплоид 4х пшеницы и <i>Ae. ventricosa</i>	56	BBAAD ^d D ⁿ N ⁿ N ⁿ	
AE 1491*	Неизвестна	?	?	IPK
<i>Haynaticum</i> , K-38259	<i>Haynaldia villosa</i> × <i>T. dicoccum</i>	42	BBAAVV	ИЦИГ
<i>Tritordeum martinii</i> , K-7997	<i>T. durum</i> × <i>Hordeum chilense</i>	42	BBAAN ^c H ^c	ВИР

Примечание. * Амфидиплоиды и геномно-замещенные формы с не подтвержденным в данном исследовании цитологически числом хромосом, геномным или хромосомным составом. НЦЗ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», Краснодар, Россия; ИЦИГ – Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия; IPK – Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Гатерслебен, Германия; ВИР – Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия.

неизвестно. Амфидиплоид полбы *T. dicoccum* Schrank ex Schübl. с *Haynaldia villosa* создан П.М. Жуковским (1944), а твердой пшеницы и дикого ячменя *Hordeum chilense* Roem. & Schult. – в Испании в начале 1980-х гг. (Martin, Sanchez-Mongelaguna, 1982; Fernández, Jouve, 1984).

Кариотипы исследованных форм изучали с помощью метода С-окрашивания хромосом по Гимза в соответствии со стандартной методикой (Badaeva et al., 1994). Для анализа *Tritordeum martinii* A. Pujadas дополнительно использовали флуоресцентную гибридизацию *in situ* – FISH (Badaeva et al., 2017) с ДНК-зондами pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) и pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980). Хромосомы пшеницы классифицировали по генетической номенклатуре (Gill et al., 1991), для классификации хромосом других видов следовали номенклатурам, предложенным в работах (Dhaliwal et al., 1990; Cabrera et al., 1995; Friebe et al., 1995a, 2000; Linc et al., 1999; Badaeva et al., 2008, 2011, 2015a; Liu et al., 2010; Adonina et al., 2015; Molnár et al., 2016; Danilova et al., 2017; Said et al., 2021).

Результаты и обсуждение

Исследование геномно-замещенных форм

Авродес

Цитогенетический анализ подтвердил, что Авродес является гексаплоидной формой, D-геном которой замещен S-геномом *Ae. speltoides* Tausch (рис. 1 и 2). Он цитологически нестабилен, число и сочетания хромосом геномов А, В и S варьируют между генотипами.

У исследованных растений Авродес к геному А относились семь или восемь пар хромосом, из которых постоянно присутствовали 1А, 2А, 4А, 5А, 6А и 7А. При этом хромосома 2А отличалась от таковой сорта Аврора наличием четкого теломерного и терминального С-бэндов. В отличие от других хромосом А-генома, хромосома 6А была представлена двумя парами, одна из которых замещала 6S. У большинства растений Авродес в кариотипе присутствовала только одна пара хромосомы 7А, но в двух генотипах обнаружена ее третья, дополнительная копия, замещающая 7В (моносомное 7А/7В замещение, см.

рис. 2, в). В кариотипе одного растения отсутствовала пара 3А хромосомы, замещенная дополнительной парой хромосомы 3S.

Лишь три из семи пар хромосом В-генома – 2В, 3В, 6В – обнаружены у всех исследованных растений Авродес. Пшенично-ржаная транслокация 1ВL:1RS, унаследованная от сорта Аврора, присутствовала у всех растений, но в разных генотипах транслоцированная хромосома могла быть представлена двумя или одной копиями (моносомное 1ВL:1RS/1S замещение) или же была модифицирована в результате транслокации неидентифицируемого фрагмента на дистальную часть длинного плеча хромосомы 1В (см. рис. 2, а, отмечено красной стрелкой).

Часть растений оказались нулли4В-тетра4S (см. рис. 2, а, б), другие – нулли5В-тетра5S, при этом две пары 5S хромосом отличались рисунками С-окрашивания (см. рис. 2, в, отмечены зелеными стрелками). Одна пара полностью соответствовала хромосоме 5S *Ae. speltoides*,

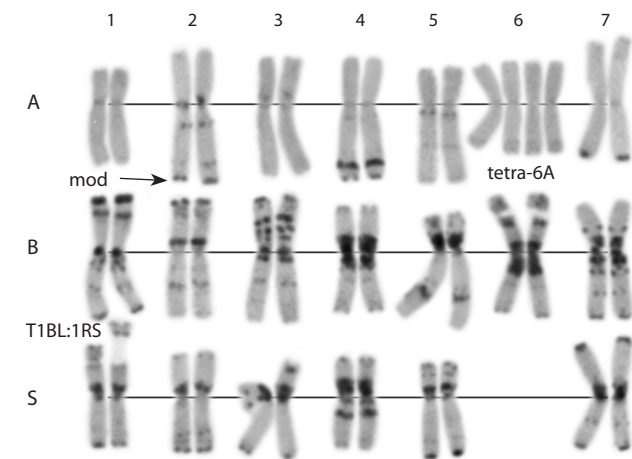


Рис. 1. Дифференциально окрашенный кариотип геномно-замещенной формы Авродес.

А, В, S – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

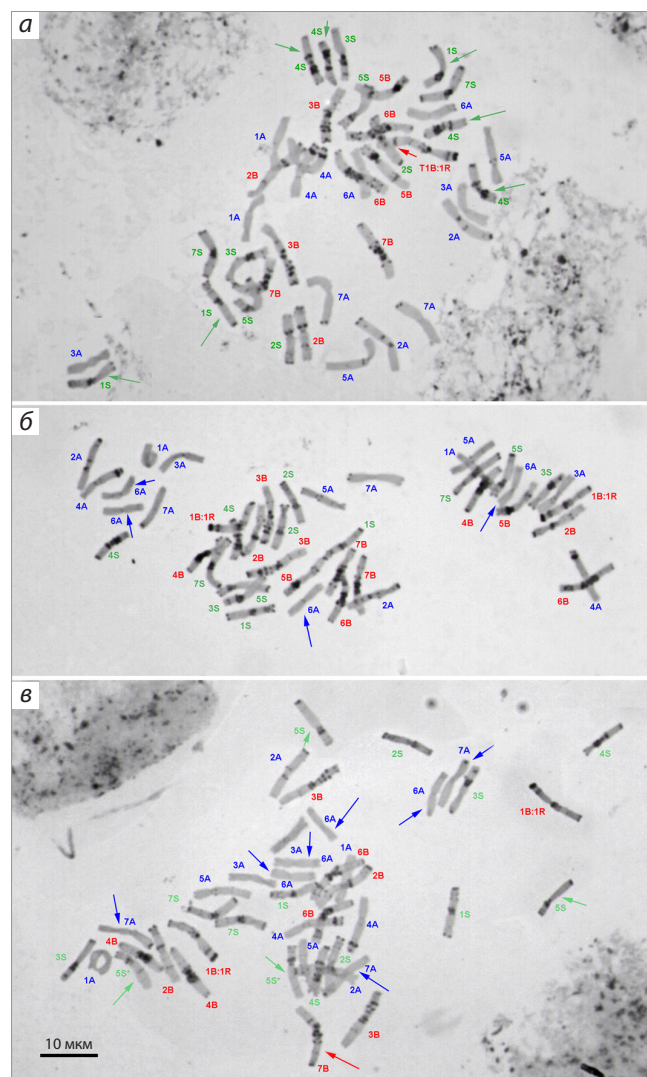


Рис. 2. Дифференциально окрашенные метафазные пластинки отдельных растений геномно-замещенной формы Авродес с разными комбинациями хромосом.

Моно-, три- и тетрасомные хромосомы отмечены стрелками: красными – для В-генома, синими – для А-генома, зелеными – для S-генома.

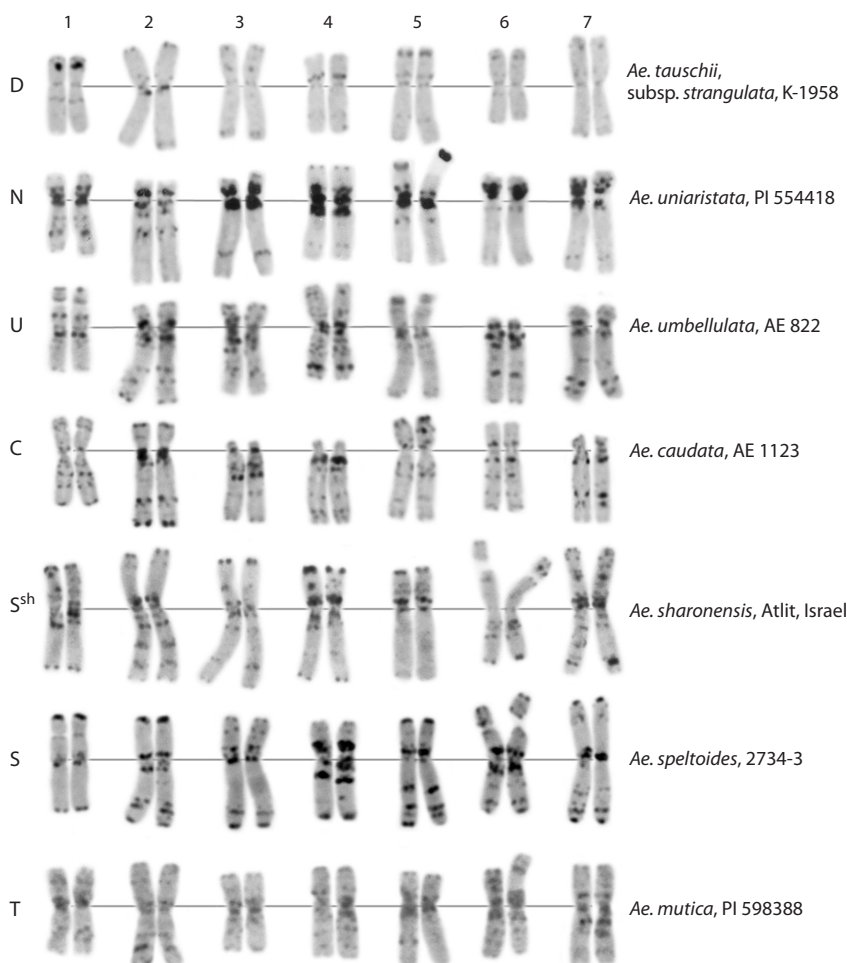


Рис. 3. Дифференциально окрашенные кариотипы диплоидных видов рода *Aegilops*, предположительно и/или фактически участвовавших в получении геномно-замещенных форм пшеницы.

Для иллюстрации взяты «типичные» образцы видов, которые не участвовали в получении исследованных форм. Геномные символы видов (D–T) даны слева, названия видов и происхождение/коллекционные номера образцов – справа.

тогда как вторая, обозначенная нами 5S*, была короче и не несла крупного теломерного бэнда в длинном плече (рис. 3). Отметим, что именно эта модифицированная пара хромосом перешла в селекционные образцы мягкой пшеницы, устойчивые к желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks.), полученные с участием Авродеса (Давоян Э.Р. и др., 2023).

К S-геному у разных растений Авродес относились от 12 до 16 хромосом, при этом ни в одном генотипе не было обнаружено хромосомы 6S (см. рис. 2). Из всех хромосом S-генома только 2S и 7S присутствовали исключительно в дисомном состоянии. Хромосомы 3S, 4S и 5S встречались как в ди-, так и в тетрасомном состоянии. Следует отметить, что 3S хромосома замещала гомеологи из A-генома, а 4S и 5S – из B-генома. В большинстве растений обнаружена пара 1S хромосом, и лишь в двух растениях найдена дополнительная, третья хромосома 1S, замещающая 1BL:1RS (моносомное 1S/1BL:1RS замещение, см. рис. 2, а).

Высокая цитологическая нестабильность Авродеса проявлялась также в нарушении мейотической конъюгации хромосом, в частности в высокой частоте образования мультивалентов, отмеченной ранее многими авторами (Давоян Р.О. и др., 2012, 2019). Высокая частота мультивалентов может быть обусловлена как присутствием в S-геноме генов-супрессоров – *Ph1*/промоторов гомеологичной конъюгации хромосом (Dvořák et al., 2006),

так и наличием в большинстве растений межгеномных B/S или A/S замен, когда некоторые хромосомы *Ae. speltooides* представлены в трех или четырех копиях. Определенный вклад в геномную нестабильность Авродеса могли вносить гаметоцидные гены, которые у *Ae. speltooides* локализованы на хромосомах 2S и 6S (Tsujimoto, Tsunewaki, 1988; King J. et al., 2018; Said et al., 2024). Интересно, что во всех исследованных генотипах Авродеса мы находили только одну из гаметоцидных хромосом – 2S, тогда как 6S была утрачена.

Аврозис

Аврозис – гексаплоидная форма, D-геном которой заменен S^{sh}-геномом *Ae. sharonensis* Eig. Цитогенетический анализ с использованием С-бэндинга подтвердил наличие геномов А, В и S^{sh} в ее кариотипе (рис. 4). Аврозис, как и Авродес, являлся носителем пшенично-ржаной транслокации 1BL:1RS. Геномы А и В этих форм различались рисунками С-окрашивания хромосом 2А, 2В, 3В и 5В. В отличие от Авродеса, Аврозис был цитологически стабильным: все исследованные растения имели одинаковый состав хромосом и рисунки С-бэндинга.

Единственное исключение составила хромосома T1B:1R: у некоторых растений дистальная часть короткого плеча была делетирована. Хромосомы генома S^{sh} имели типичные для *Ae. sharonensis* морфологию и рисунки распределения гетерохроматина (см. рис. 4), к сожалению, родительская форма, использованная для получения Аврозиса, авторами не указана, поэтому выявить изменения хромосом, связанные с полиплоидизацией, невозможно.

Аврозис нашел ограниченное применение в селекции как донор гена устойчивости к мучнистой росе (*Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* Marshal) (Жиров, Терновская, 1993), хотя *Ae. sharonensis* обладает множеством хозяйственно ценных признаков (Olivera, Steffenson, 2009; Millet et al., 2014). Сложность работы с Аврозисом связана с наличием в геноме S^{sh} высокоэффективных гаметоцидных генов *Gc* (Tsujimoto, Tsunewaki, 1984, 1988; Said et al., 2024), действие которых вызывает летальность гамет, утративших хромосому 4S^{sh}, несущую данный ген. Это обеспечивает преимущественную передачу хромосомы 4S^{sh} через гаметы (Miller et al., 1982; King I. et al., 1991).

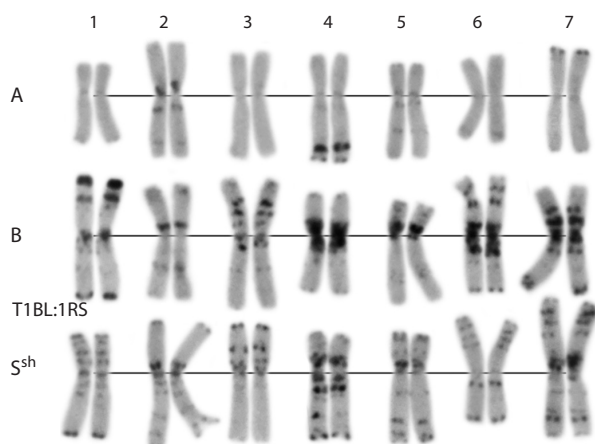


Рис. 4. Кариотип геномно-замещенной формы Аврозис.
A, B, S^{sh} – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

В то же время ряду исследователей удалось получить интрогрессивные линии пшеницы и *Ae. sharonensis* по хромосомам других гомеологических групп, в частности 1S^{sh} и 5S^{sh} (Millet et al., 2014). Учитывая эти результаты, можно надеяться, что возможность передачи в потомство других S^{sh} хромосом существует и что генетический потенциал Аврозиса для улучшения мягкой пшеницы еще не исчерпан.

Авролата

Авролата – гексаплоидная форма пшеницы, D-геном которой заменен U-геномом *Ae. umbellulata*. Как и Аврозис, это цитологически стабильная форма, у которой все растения имели идентичный геномный состав и рисунки бэндинга. Хромосомных перестроек в исследованном нами образце не обнаружено. Цитогенетический анализ с использованием С-окрашивания подтвердил наличие геномов A, B и U в кариотипе этой формы (рис. 5). В отличие от Авродеса и Аврозиса, у Авролаты не выявлено пшенично-ржаной транслокации 1BL:1RS, вместо нее есть «нормальная» пшеничная хромосома 1B.

Рисунки дифференциального окрашивания хромосом A- и B-геномов в целом сходны с таковыми Аврозиса, а хромосомы U-генома имели типичные для *Ae. umbellulata* морфологию и рисунки бэндинга (см. рис. 3 и 5). Поскольку родительская форма *Ae. umbellulata*, участвовавшая в создании Авролаты, неизвестна, оценить возможные изменения хромосом U-генома в составе гибрида не удалось.

Отсутствие пшенично-ржаной транслокации 1BL:1RS в ее кариотипе может быть связано с тем, что сорт Аврора исходно был гетерогенным по наличию транслокации и в получении Авролаты принимал участие биотип без этой транслокации. Не исключено, что в процессе рекуррентных скрещиваний при экстракции тетракомпонента сорта Аврора могла сохраниться хромосома 1B твердой пшеницы.

Согласно исследованиям (Давоян Р.О. и др., 2012; Давоян Э.Р. и др., 2012), Авролата, наряду с Авродесом, является источником новых генов устойчивости к листовой ржавчине (*Puccinia tritricina* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* Eriks.). *Ae. umbellulata* – донор U-генома этой формы,

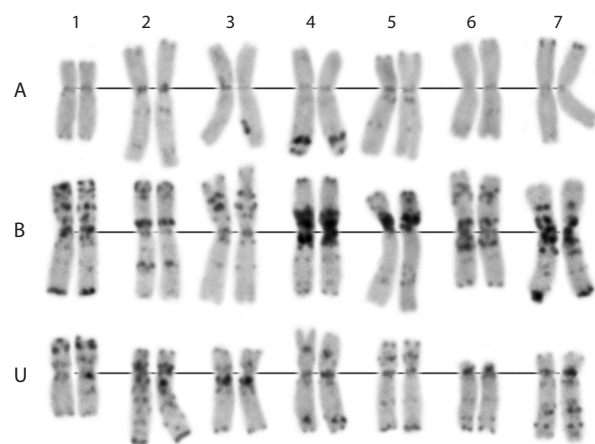


Рис. 5. Кариотип геномно-замещенной формы Авролата.
A, B, U – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

активно используется в селекции мягкой пшеницы, особенно в США, как донор гена устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* (Friebe et al., 1996b; McIntosh et al., 2013). Согласно данным генеалогического анализа, доля сортов, полученных с участием *Ae. umbellulata*, постоянно увеличивается и в 2000-х гг. составляла 25–29 % (Мартынов и др., 2015). Несмотря на то что у Авролаты обнаружен ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, его не удалось выявить в потомстве этой формы (Давоян Э.Р. и др., 2012). Очевидно, что устойчивость образцов обусловлена новым(и), еще не идентифицированным(и) *Lr* геном(ами). Авролата нашла применение и в селекции других культур: молекулярно-генетическое исследование показало перенос 1U и 2U хромосом в потомство гибридов Авролаты с озимыми сортами гексаплоидных тритикале (Орловская и др., 2015).

Авротики

Авротика – это геномно-замещенная форма, родительскими формами которой послужили сорт мягкой пшеницы Аврора и *Ae. mutica* Boiss. (syn. *Amblyopyrum muticum* (Boiss.) Eig, T-геном). Цитогенетический анализ подтвердил, что Авротика содержит хромосомы геномов A, B пшеницы и генома T *Ae. mutica*, однако, в отличие от ранее рассмотренных геномно-замещенных форм, у Авротики обнаружена более сложная комбинация хромосом родительских видов.

В кариотипе этой формы сохранились две хромосомы D-генома – 1D и 3D, но отсутствовали 1A пшеницы и 3T *Ae. mutica* (рис. 6). Таким образом, чужеродный геном в этой форме представлен не полностью, а лишь шестью парами хромосом. Как и у Авролаты, у Авротики нет пшенично-ржаной транслокации 1BL:1RS, хотя рисунки С-окрашивания других хромосом сходны с таковыми Авродеса. Сравнить хромосомы T-генома с хромосомами родительского образца *Ae. mutica* не представлялось возможным, поскольку авторами не была указана исходная форма. Следует отметить, что у амфидиплоида гомологичные хромосомы имели идентичные рисунки бэндинга, тогда как диплоидный вид характеризуется высоким полиморфизмом, в частности гетероморфизмом гомологов

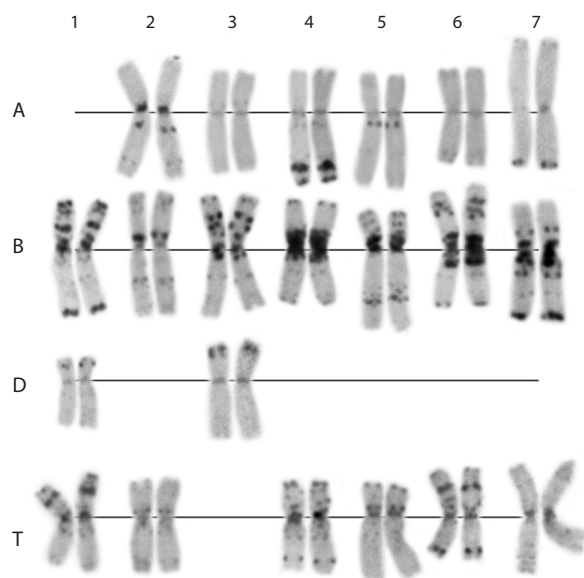


Рис. 6. Кариотип геномно-замещенной формы Авротика.

A, B, D, T – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

по рисункам дифференциального окрашивания (Friebe et al., 1996a).

Несмотря на то что Авротика показала устойчивость к ржавчине (Давоян Р.О. и др., 2012, 2019), этот признак не удалось передать мягкой пшенице. В то же время китайская группа получила устойчивый к мучнистой росе неполный амфидиплоидный гибрид сорта Chinese Spring с *Ae. mutica* и дополненную по хромосоме 7T линию (Liu et al., 2015). Авторы выявили у аллополиплоида наличие полного набора Т-хромосом, хотя пара хромосом пшеницы 7В при этом отсутствовала.

Другие исследователи скрестили мягкую пшеницу (сорта Chinese Spring и Pavon 76) с образцом *Ae. mutica*, содержащим гены-супрессоры *Ph1*/промоторы гомеологической конъюгации (King J. et al., 2017). Гибриды F₁ два-три раза бэккроссировали родительским сортом. Растения проверяли на наличие чужеродного материала методом однонуклеотидного полиморфизма (SNP-методом) и от генотипов с единичными интрогрессиями получали дигаметоидные растения. В результате было выделено 67 гомозиготных и стабильно наследуемых интрогрессивных линий, охватывающих шесть из семи возможных хромосом *Ae. mutica* (King J. et al., 2019). Следует отметить, что авторам не удалось получить интрогрессивные линии по хромосоме 3Т, которая также отсутствовала у Авротика. Возможно, эта хромосома содержит гены, негативно влияющие на жизнеспособность и/или фертильность аллополиплоида *T. aestivum* × *Ae. mutica*, и поэтому растения, несущие хромосомы 3Т, выбраковываются отбором уже в ранних гибридных поколениях.

Авродата

В соответствии с родословной, Авродата была получена с участием мягкой пшеницы сорта Аврора и *Ae. caudata* L. (syn. *Ae. markgrafii* (Greuter) Hammer). Цитогенетический анализ подтвердил наличие у гибрида АВ-геномов пшеницы и С-генома *Ae. caudata* (см. рис. 3, рис. 7). Все

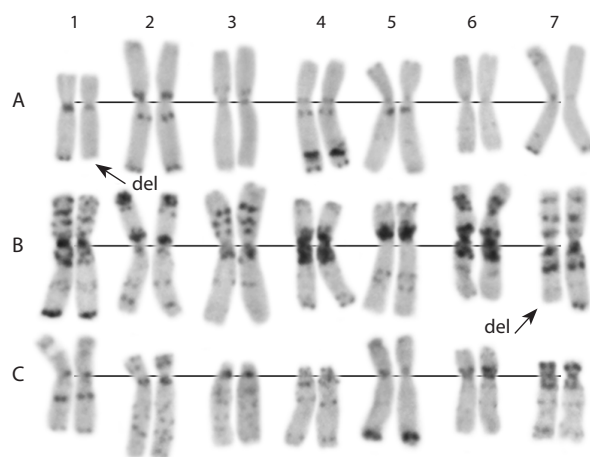


Рис. 7. Кариотип геномно-замещенной формы Авродата.

A, B, C – геномы; 1–7 – гомеологические группы. Стрелкой отмечена терминальная делеция/транслокация, затрагивающая длинные плечи хромосом 1А и 7В.

исследованные растения имели одинаковый хромосомный состав, но в некоторых растениях встречались хромосомные перестройки (см. рис. 7). У гибридов пшеницы с *Ae. caudata* они могут возникать под действием гаметоцидных генов, локализованных на хромосоме 3С этого вида (Endo, Tsunewaki, 1975).

В кариотипе Авродаты не найдено пшенично-ржаной транслокации 1BL:1RS, а рисунки С-окрашивания большинства хромосом А- и В-геномов пшеницы (например, 2А, 4А, 5А, 6А, 1В, 2В, 5В, 6В, 7В) отличались от соответствующих хромосом других геномно-замещенных форм, полученных с участием сорта Аврора. Хромосома 7В, в частности, по рисунку бэндинга больше напоминала хромосому 7В твердой пшеницы, чем мягкой. Эти результаты дают основание считать, что Авродата получена от другой родительской формы пшеницы или что при экстракции тетракомпонента из сорта Аврора в него удалось передать не все, а лишь часть хромосом геномов А и В мягкой пшеницы. Наличие несбалансированных хромосомных перестроек у растений Авродаты указывает на цитологическую нестабильность этой геномно-замещенной формы. В литературе информации об использовании данного образца в селекции нет.

Геномно-дополненный амфидиплоид мягкой пшеницы сорта Alcedo и *Ae. caudata* был синтезирован в Германии (Blüthner et al., 1988). Октаплоидный амфидиплоид и созданные на его основе дополненные линии были проанализированы с помощью С-бэндинга, помимо этого изучена конъюгация хромосом в мейозе (Blüthner et al., 1988; Friebe et al., 1992). Хотя в мейозе всех полученных форм были выявлены многочисленные нарушения, никаких отклонений в рисунках С-окрашивания, вызванных хромосомными перестройками, авторы не обнаружили (Friebe et al., 1992). Отличия, выявленные у амфидиплоида по рисункам окрашивания некоторых хромосом пшеницы, они связали с возможным участием других сортов пшеницы в его получении.

Невостребованность Авродаты в селекционных программах может быть обусловлена сложностью передачи

генетического материала из С-генома в мягкую пшеницу, связанной с большим числом видоспецифических хромосомных перестроек, выявленных у *Ae. caudata* (Danilova et al., 2017; Gong et al., 2017; Grewal et al., 2020), а также присутствием гаметоцидных генов на хромосомах этого вида.

Авротата

Исследование показало, что Авротата – цитологически стабильная гексаплоидная форма, в кариотипе которой выявлены А- и В-геномы пшеницы, но хромосомы, соответствующие N-геному *Ae. uniaristata* Vis., обнаружены не были (см. рис. 3, рис. 8). Третий геном Авротаты показал наибольшее сходство с геномом D диплоидного *Ae. tauschii* subsp. *strangulata* Eig (см. рис. 3), который отличается от D-генома пшеницы рисунками С-окрашивания хромосом 3D и 6D. Возможно, третий геном Авротаты, D^t, является смешанным и включает хромосомы как диплоидного эгилопса, так и мягкой пшеницы, однако методом С-бэндинга это установить невозможно из-за высокого сходства ортологичных хромосом данных геномов.

Ae. uniaristata характеризуется толерантностью к солям алюминия. Для переноса этого признака от эгилопса в геном мягкой пшеницы в Великобритании был синтезирован гибрид сорта мягкой пшеницы Chinese Spring и *Ae. uniaristata*, который в дальнейшем был использован для создания серии дополненных линий (Miller et al., 1995). Авторы показали, что устойчивость к алюминию контролируется хромосомой 3N (Iqbal et al., 2000b). Анализ дополненных линий с помощью гибридизации *in situ* (Iqbal et al., 2000a), а позже – С-бэндинга (Badaeva et al., 2011) подтвердил, что они содержат хромосомы *Ae. uniaristata*, и позволил привести в соответствие цитологическую и генетическую классификации хромосом N-генома.

Картирование RFLP-маркеров на хромосомах *Ae. uniaristata* показало, что они существенно перестроены относительно гомеологичных хромосом пшеницы вследствие N-геном-специфичных транслокаций и инверсий (Iqbal et al., 2000b). Глубокие структурные преобразования хромосом *Ae. uniaristata* в процессе видообразования подтвердили результаты хромосомного пэинтинга с использованием

наборов олигопроб, специфичных для каждой из семи гомеологических групп *Triticeae* Dumort. (Li et al., 2020). Логично предположить, что дивергенция гомеологичных хромосом пшеницы и *Ae. uniaristata* осложняет перенос генетического материала между видами, в частности, создание стабильных жизнеспособных амфидиплоидов и геномно-замещенных форм. К сожалению, доступных данных о цитологической верификации геномного состава Авротаты на этапе ее создания не опубликовано. В связи с этим невозможно определить, обусловлено ли отсутствие у Авротаты N-генома способом получения самой формы или же заменой N-генома на D в процессе длительного репродуцирования образца.

Исследование пшенично-эгилопсных амфидиплоидов

Амфидиплоид AD 7

AD 7 – спонтанный амфидиплоид тетраплоидной пшеницы *T. ispahanicum* Heslot (геном BBAA) и тетраплоидного *Ae. cylindrica* Host (геном D^cD^cC^cC^c). Исходная форма AD 7 была октаплоидом $2n = 8x = 56$ с геномным составом BBAA D^cD^cC^cC^c (Мустафаев, Пиралов, 1981). Цитогенетический анализ с использованием С-бэндинга подтвердил происхождение данного образца от *Ae. cylindrica*, но показал, что в процессе его воспроизведения произошла редукция числа хромосом до гексаплоидного уровня.

У AD 7 полностью сохранились хромосомы А-генома пшеницы и С^c-генома *Ae. cylindrica*. Третий (синтетический) геном представлял собой комбинацию хромосом В-генома пшеницы и D^c-генома *Ae. cylindrica* и включал представителей всех семи гомеологических групп: 1D^c1D^c 2B2B 3D^c3D^c 4D^c4D^c 5B5B 6D^c6D^c 7B7B (рис. 9). Хромосомы D^c-генома имели типичные для *Ae. cylindrica* рисунки дифференциального окрашивания (Linc et al., 1999; Badaeva et al., 2002). Часть исследованных растений оказались моносомными по хромосоме 6A ($2n = 41$). Хромосомных перестроек у растений исследованного образца не обнаружено.

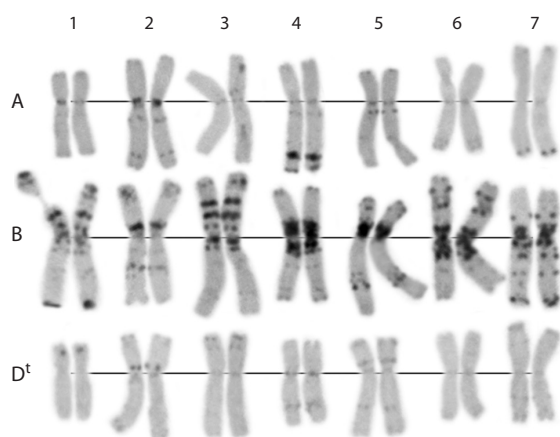


Рис. 8. Кариотип геномно-замещенной формы Авротата.

A, B, D^t – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

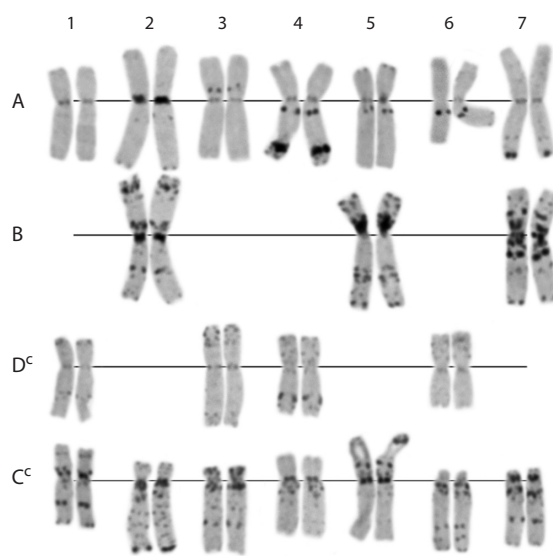


Рис. 9. Кариотип амфидиплоида AD 7.

A, B, D^c, C^c – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

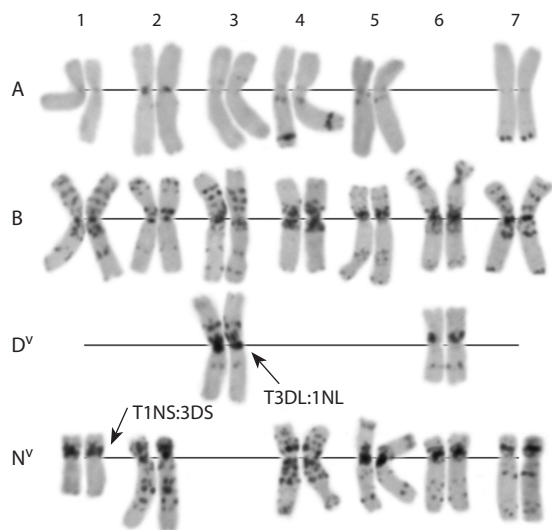


Рис. 10. Кариотип амфидиплоида AD 7147.

A, B, D^v, N^v – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

Амфидиплоид AD 7147

Амфидиплоид AD 7147 был получен Г.Р. Пираловым (1976) при скрещивании тетраплоидной пшеницы и *Ae. ventricosa* (Мустафаев, Пиралов, 1981). Восстановление числа хромосом до октаплоидного уровня произошло спонтанно, как предполагал автор, за счет слияния нередуцированных гамет. В мейозе 56-хромосомного исходного амфидиплоида наблюдали регулярную конъюгацию хромосом с образованием 28 бивалентов. Анализ потомка AD 7147 методом С-бэндинга показал, что он действительно является гибридом тетраплоидного вида пшеницы (геном BBAA) и *Ae. ventricosa* (геном D^vD^vN^vN^v) (рис. 10). Рисунки дифференциального окрашивания хромосом геномов А и В отличались от рисунка С-бэндинга, «типичного» для твердой пшеницы, и больше соответствовали таковому *T. carthlicum* Nevski или европейскому типу полбы *T. dicoccum* (Badaeva et al., 2015b).

Мы выявили, что AD 7147 является носителем транслокации 1N^v:3D^v, которая, скорее всего, унаследована от родительского образца эгилопса. Данная перестройка широко распространена в природных популяциях *Ae. ventricosa* (Badaeva et al., 2002, 2011). У AD 7147, как и у предыдущего амфидиплоида, произошла редукция числа хромосом до гексаплоидного уровня за счет потери одного смешанного генома. В этом случае В-геном пшеницы сохранился полностью, из N^v-генома *Ae. ventricosa* была утрачена 3N^v, из А-генома пшеницы – 6А. Таким образом, редукция числа хромосом у гибрида происходила преимущественно за счет D^v-генома *Ae. ventricosa*, от которого сохранились только две пары хромосом – 3D^v (в виде двух транслоцированных хромосом T1N^v:3D^v) и 6D^v.

Ae. ventricosa – тетраплоидный вид, широко используемый в современной селекции пшеницы как донор генов устойчивости к болезням и вредителям (Dosba, Doussinault, 1978; García-Olmedo et al., 1984; Delibes et al., 1987, 1988). Кластер генов *Sr38/Lr37/Yr17*, унаследованный от *Ae. ventricosa* (Tanguy et al., 2005), был картирован на хромосоме 2А (Bariana, McIntosh, 1994). В соответствии

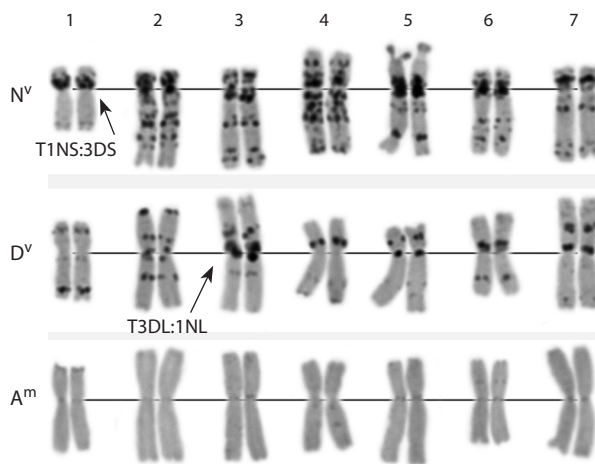


Рис. 11. Кариотип образца AE 1491.

N^v, D^v, A^m – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

с данными анализа родословных (Мартынов и др., 2015), эта интрогрессия присутствует более чем у 34–37 % современных сортов мягкой пшеницы, преимущественно из Европы. Интрогрессия ведет происхождение от французского селекционного образца VPM-1, полученного Maia в 1967 г. путем гибридизации сорта мягкой пшеницы Marne и амфидиплоида *Ae. ventricosa* × *T. persicum* Vav. (syn. *T. carthlicum*) (Dosba et al., 1978). Очевидно, что геномный состав этого амфидиплоида близок таковому исходной формы AD 7147. К сожалению, проверить современный статус французского гибрида не представляется возможным. У нас также нет сведений об использовании AD 7147 в селекции пшеницы, хотя по аналогии с *Ae. ventricosa* × *T. persicum*, полученным во Франции, он может быть весьма перспективным донором хозяйственно важных признаков.

Амфидиплоид AE 1491

Аллогексаплоид AE 1491 обнаружен случайно при исследовании образцов эгилопсов из коллекции Института культурных растений (ИПК, Гатерслебен, Германия). На основании анализа морфологии и рисунков дифференциального окрашивания хромосом (рис. 11) высказано предположение, что этот образец является гибридом тетраплоидного *Ae. ventricosa* (геном D^vD^vN^vN^v) и пшеницы-однозернянки, вероятно, *T. boeoticum* Boiss. (геном A^bA^b) или *T. monoccum* L. (геном A^mA^m). Поскольку в кариотипе AE 1491 была идентифицирована транслокация 1N^v:3D^v, можно предположить, что она присутствовала также у родительской формы *Ae. ventricosa*.

Среди генотипов AE 1491 случаев анеуплоидии, значительных изменений рисунков С-окрашивания относительно родительских видов (Badaeva et al., 2002, 2015a) или возникновения новых вариантов структурных перестроек хромосом обнаружено не было. Амфидиплоид *T. aegilopoides* Link (syn. *T. boeoticum*) × *Ae. ventricosa* получен и исследован в работах (Siddiqui, 2009; Siddiqui et al., 2009). Соответствует ли этот изученный процитированными выше авторами амфидиплоид изученному нами образцу, неизвестно.

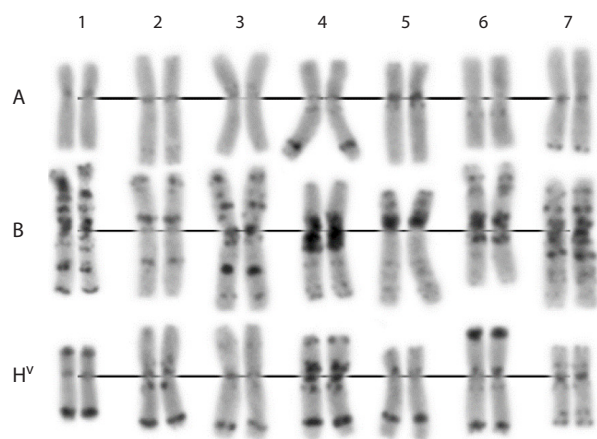


Рис. 12. Кариотип *Haynaticum*.

A, B, H^V – геномы; 1–7 – гомеологические группы.

Исследование амфидиплоидов пшеницы

Haynaticum Zhuk.

Успешные попытки создания амфидиплоида пшеницы и *Dasyphyrum villosum* (syn. *Haynaldia villosa*) предпринимались учеными разных стран с конца XIX – начала XX в. Скрещивания проводили с разными видами пшеницы, чаще с тетраплоидной (*T. dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebn.) Schweinf., *T. dicoccum* Schrank ex Schübl., *T. turgidum* L., *T. aethiopicum* Jakubz., *T. durum* Desf., *T. araraticum* Jakubz., *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk.), реже с гексаплоидной (спельта и мягкая пшеница) (Pace et al., 2011). Изученный нами амфидиплоид *T. dicoccum* × *D. villosum* был получен П.М. Жуковским и назван *Haynaticum* Zhuk. (syn. *Triticum* × *turgidovillosum* Tschermak) (Жуковский, 1944) и поддерживается в коллекции ВИР под номером К-38259.

Исследование показало, что данный образец содержит полные наборы хромосом А- и В-геномов пшеницы и H^V-геном *D. villosum* (рис. 12). Рисунки С-окрашивания хромосом пшеницы сходны с таковыми у закавказской группы культурной полбы (Badaeva et al., 2015b), и можно предположить, что родительской формой этого аллополиплоида послужил образец *T. dicoccum* из Армении, Азербайджана или прилегающих к ним районов Турции или Ирана. Все изученные растения *Haynaticum* были эуплоидными ($2n = 6x = 42$) и не содержали хромосомных перестроек. Этот факт, а также отсутствие явных изменений рисунков С-бэндинга свидетельствуют о высокой цитологической стабильности образца, полученного почти 85 лет назад.

D. villosum является ценным источником генов устойчивости к болезням. Его амфидиплоиды и полученные на их основе замещенные и дополненные линии широко используются в селекционной практике в Китае (Huang et al., 2007; Zhang W. et al., 2013) и других странах. Исследованный нами образец несколько отличается от них по распределению блоков гетерохроматина на хромосомах пшеницы и *Haynaldia villosa* и может содержать другой набор генов устойчивости.

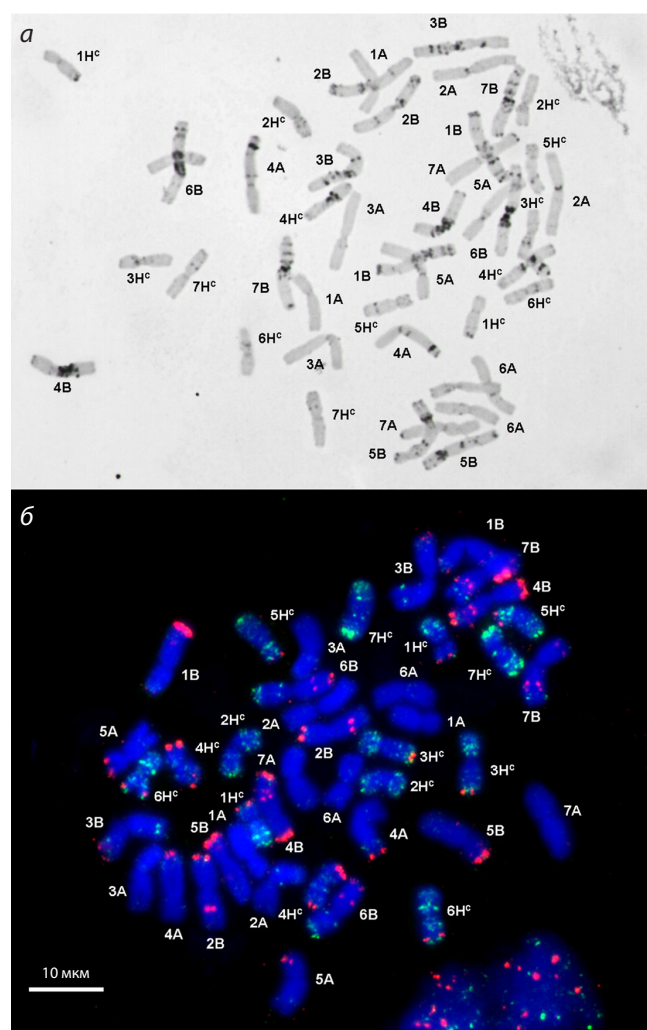


Рис. 13. Дифференциально окрашенная метафазная пластинка (а) и распределение pAs1 и pSc119.2 зондов на хромосомах *Tritordeum* (б). Хромосомы обозначены в соответствии с генетической номенклатурой: 1А–7А – А-геном пшеницы; 1В–7В – В-геном пшеницы; H^c – геном *H. chilense*.

Tritordeum martinii A. Pujadas

Амфидиплоид твердой пшеницы *T. durum* и дикого ячменя *Hordeum chilense* был синтезирован в начале 1980-х гг. как мостик для переноса хозяйственно полезных генов от ячменя в пшеницу (Martin, Sanchez-Mongelaguna, 1982). Его кариотип был детально исследован с помощью С-метода дифференциального окрашивания хромосом (Cabrera et al., 1995) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с разными типами ДНК-зондов (Prieto et al., 2004; Martín, Cabrera, 2005).

Анализ хромосомного набора тритордеума с помощью С-бэндинга (рис. 13, а) и FISH с pAs1 (зеленый) и pSc119.2 (красный) зондами (см. рис. 13, б) подтвердил наличие у него геномов А, В и H^c, рисунки бэндинга и паттерны гибридизации которых не отличались от описанных в литературе. Случаев анеуплоидии и хромосомных перестроек также не обнаружено, что говорит о высокой цитологической стабильности данного образца.

Закключение

Нельзя не согласиться, что цитологическая стабильность имеет большое значение для сохранения и размножения созданных исследователями аллополиплоидов, некоторые из которых в настоящее время рассматриваются как новые, перспективные сельскохозяйственные культуры (De Caro et al., 2024).

Суммируя приведенные выше результаты по исследованию геномно-замещенных и синтетических геномно-дополненных амфидиплоидов пшеницы с отдельными видами из родов *Aegilops*, *Haynaldia* (*Dasyphyrum*) и *Hordeum* L., можно сделать следующие выводы.

- Аллополиплоидные формы, содержащие 42 хромосомы, более стабильны по хромосомному составу, чем 56-хромосомные.
- Гексаплоидные формы, содержащие одновременно в своем кариотипе родственные геномы В и S (например, Авродес), могут оставаться цитологически нестабильными на протяжении многих поколений. Цитологическая нестабильность выражается у них, в частности, гетерогенностью хромосомного состава в разных генотипах, моно- или дисомными замещениями хромосом родственных геномов и повышенной частотой хромосомных перестроек.
- Несоответствие хромосомного состава ряда геномно-замещенных форм указывает на то, что их использование в селекции и филогенетических исследованиях должно проводиться только после тщательного предварительного цитогенетического изучения – обязательной верификации.
- Наиболее существенные преобразования родительских геномов выявлены у октаплоидных амфидиплоидов. Это выражалось, прежде всего, в редукции числа хромосом до гексаплоидного уровня. При этом хромосомы элиминировались из разных родительских геномов (в зависимости от происхождения полиплоида).
- Несмотря на то что по хозяйственно важным показателям синтетические амфидиплоиды уступают современным коммерческим сортам пшеницы, содержащиеся в них гены, контролирующие моно- и полигенно эти признаки, по эффективности могут превосходить гены мягкой пшеницы. Кроме того, генофонд синтетических пшениц может стать источником новых генов устойчивости к биотическим (Гончаров и др., 2020) и абиотическим (Mahmood et al., 2023) стрессам для мягкой пшеницы.

Список литературы / References

Беспалова Л.А. Развитие генофонда как главный фактор третьей зеленой революции в селекции пшеницы. *Вестн. Рос. акад. наук*. 2015;85(1):9-11. DOI 10.7868/S086958731501003X
[Bespalova L.A. Broadening the genepool as the major factor of the third Green Revolution in wheat breeding. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2015; 85(1):9-11. DOI 10.7868/S086958731501003X (in Russian)]
Гончаров Н.П., Богуславский Р.Л., Орлова Е.А., Белоусова М.Х., Аминов Н.Х., Коновалов А.А., Кондратенко Е.Я., Гуляева Е.И. Устойчивость амфидиплоидов пшеницы к возбудителю бурой ржавчины. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 6(3):95-106. DOI 10.18699/Letters2020-6-14

[Goncharov N.P., Boguslavsky R.L., Orlova E.A., Belousova M.Kh., Aminov N.Kh., Konovalov A.A., Kondratenko E.Ya., Gulyaeva E.I. Leaf rust resistance in wheat amphidiploids. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(3):95-106. DOI 10.18699/Letters2020-6-14 (in Russian)]
Давоян Р.О., Жиров Е.Г. Геномно-замещенная форма Авродес как источник устойчивости растений мягкой пшеницы к листовой ржавчине и мучнистой росе. *С.-х. биология*. 1995;30(1):98-101
[Davoyan R.O., Zhirov E.G. Genome-substituted form Avrodes as the source of soft wheat plant resistance to leaf rust and powdery mildew. *Selkhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1995;30(1):98-101 (in Russian)]
Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зинченко А.Н., Давоян Э.Р., Кравченко А.М., Зубанова Ю.С. Синтетические формы как основа для сохранения и использования генофонда диких сородичей мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):44-51
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zinchenko A.N., Davoyan E.R., Kravchenko A.M., Zubanova Y.S. The use of synthetic forms in preservation and exploitation of the gene pool of wild common wheat relatives. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2(6):480-485. DOI 10.1134/S2079059712060044]
Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.Н. Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019; 23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556 (in Russian)]
Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зубанова Ю.С., Зинченко А.Н., Кравченко А.М. Идентификация генов устойчивости к листовой ржавчине в видах *Aegilops* L., синтетических формах и интрогрессивных линиях мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):116-122
[Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Y.S., Kravchenko A.M., Zinchenko A.N. Identification of a leaf-rust resistance gene in species of *Aegilops* L., synthetic forms, and introgression lines of common wheat. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012;2(4):325-329. DOI 10.1134/S2079059712040041]
Давоян Э.Р., Бебякина И.В., Давоян Р.О., Болдаков Д.М., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.Н., Зубанова Ю.С. Изучение линий мягкой пшеницы, полученных с участием синтетической формы Авродес, в отношении их устойчивости к желтой ржавчине. *Биотехнология и селекция растений*. 2023; 6(3):25-34. DOI 10.30901/2658-6266-2023-3-04
[Davoyan E.R., Bebyakina I.V., Davoyan R.O., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N., Zubanova Yu.S. A study of bread wheat lines from crosses with the synthetic form Avrodes in regard to their yellow rust resistance. *Biotechnologiya i Seleksiya Rastenii = Plant Biotechnology and Breeding*. 2023;6(3):25-34. DOI 10.30901/2658-6266-2023-3-04 (in Russian)]
Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. *Вестн. С.-х. наук*. 1984;10:58-66
[Zhirov E.G., Ternovskaya T.K. Genome engineering in wheat. *Vestnik Sel'skokhozyaystvennykh Nauk = Herald of Agricultural Sciences*. 1984;10:58-66 (in Russian)]
Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Передача пшенице *Triticum aestivum* L. хромосомы *Aegilops sharonensis* Eig, придающей ей устойчивость к мучнистой росе. *Генетика*. 1993;29(4):639-645

- [Zhiron E.G., Ternovskaya T.K. Transfer of the chromosome conferring mildew resistance from *Aegilops sharonensis* Eig into *Triticum aestivum* L. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 1993;29(4):639-645 (in Russian)]
- Жуковский П.М. Этюды в области гибридизации, иммунитета и трансплантации растений. *Труды Моск. с.-х. академии им. К.А. Тимирязева*. 1944;6:3-48
- [Zhukovsky P.M. Studies on hybridization and immunity of plants. *Trudy Moskovskoi Selskhozaystvennoi Akademii imeni K.A. Timiryazeva = Proceedings of the Timiryazev Moscow Agricultural Academy*. 1944;6:3-48 (in Russian)]
- Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы (обзор). *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 (review). *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409eng]
- Мартынов С.П., Добровотворская Т.В., Пухальский В.А. Динамика генетического разнообразия сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), районированных на территории России в 1929–2005 гг. *Генетика*. 2006;42(10):1359-1371
- [Martynov S.P., Dobrovotorskaya T.V., Pukhalskiy V.A. Dynamics of genetic diversity in winter common wheat *Triticum aestivum* L. cultivars released in Russia from 1929 to 2005. *Russ. J. Genet.* 2006;42(10):1137-1147. DOI 10.1134/S1022795406100061]
- Мартынов С.П., Добровотворская Т.В., Митрофанова О.П. Генеалогический анализ распространения генетического материала эгилопсов (*Aegilops* L.) в сортах мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Генетика*. 2015;51(9):1000. DOI 10.7868/S0016675815090076
- [Martynov S.P., Dobrovotorskaya T.V., Mitrofanova O.P. Genealogical analysis of the use of aegilops (*Aegilops* L.) genetic material in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Russ. J. Genet.* 2015;51(9):855-862. DOI 10.1134/S1022795415090070]
- Мустафаев И.Д., Пиралов Г.Р. Некоторые аспекты взаимоотношений тетраплоидных видов пшеницы с *Aegilops ventricosa*. *С.-х. биология*. 1981;16(2):223-228
- [Mustafaev I.D., Piralov G.R. Some aspects of interrelations between tetraploid wheat species and *Aegilops ventricosa* Tausch. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 1981;16(2):223-228 (in Russian)]
- Орловская О.А., Леонова И.Н., Адонина И.Г., Салина Е.А., Хотылева Л.И., Шумный В.К. Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале с интрогрессиями генетического материала видов трибы Triticeae. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(5):552-560. DOI 10.18699/VJ15.072
- [Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A., Khotyleva L.V., Shumny V.K. Molecular cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the genetic material of Triticeae tribe species. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(5):527-536. DOI 10.1134/S2079059716050087]
- Пиралов Г.Р. Результаты гибридизации пшеницы с эгилопами, рожью, хайнальдийей и пыреем. В: *Генетика и селекция в Азербайджане*. Т. 1. Баку, 1976;136-137
- [Piralov G.R. The results of hybridization of wheat with aegilops, rye, *Haynaldia* and wheatgrass. In: *Genetics and Breeding in Azerbaijan*. Vol. 1. Baku, 1976;136-137 (in Russian)]
- Трубачеева Н.В., Ефремова Т.Т., Бадаева Е.Д., Кравцова Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Першина Л.А. Получение аллоплазматических и эуплазматических пшенично-ячменных дителосомных замещенных линий 7H¹L^{mar}(7D) и изучение 18S/5S митохондриального повтора у этих линий. *Генетика*. 2009;45(12):1627-1633
- [Trubacheeva N.V., Efremova T.T., Badaeva E.D., Kravtsova L.A., Belova L.I., Devyatkina E.P., Pershina L.A. Production of alloplasmic and euplasmic wheat-barley ditelosomic substitution lines 7H¹L^{mar}(7D) and analysis of the 18S/5S mitochondrial repeat in these lines. *Russ. J. Genet.* 2009;45(12):1438-1443. DOI 10.1134/S1022795409120059]
- Aberkane H., Payne T., Kishi M., Smale M., Amri A., Jamora N. Transferring diversity of goat grass to farmers' fields through the development of synthetic hexaploid wheat. *Food Secur.* 2020;12(5):1017-1033. DOI 10.1007/s12571-020-01051-w
- Adonina I.G., Goncharov N.P., Badaeva E.D., Sergeeva E.M., Petrash N.V., Salina E.A. (GAA)n microsatellite as an indicator of the A genome reorganization during wheat evolution and domestication. *Comp. Cytogenet.* 2015;9(4):533-547. DOI 10.3897/CompCytogen.v9i4.5120
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192(1-2):117-145. DOI 10.1007/BF00985912
- Badaeva E.D., Amosova A.V., Muravenko O.V., Samatadze T.E., Chikida N.N., Zelenin A.V., Raupp W.J., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 3. Evolution of the D-genome cluster. *Plant Syst. Evol.* 2002;231(1-4):163-190. DOI 10.1007/s006060200018
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Koenig J., Bernard S., Bernard M. Analysis of introgression of *Aegilops ventricosa* Tausch. genetic material in a common wheat background using C-banding. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117(5):803-811. DOI 10.1007/s00122-008-0821-4
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Zoshchuk S.A., Amosova A.V., Reader S., Bernard M., Zelenin A.V. Comparative analysis of the N-genome in diploid and polyploid *Aegilops* species. *Chromosome Res.* 2011;19(4):541-548. DOI 10.1007/s10577-011-9211-x
- Badaeva E.D., Amosova A.V., Goncharov N.P., Macas J., Ruban A.S., Grechishnikova I.V., Zoshchuk S.A., Houben A. A set of cytogenetic markers allows the precise identification of all A-genome chromosomes in diploid and polyploid wheat. *Cytogenet. Genome Res.* 2015a;146(1):71-79. DOI 10.1159/000433458
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Pukhalskiy V.A., Zelenin A.V. Chromosomal changes over the course of polyploid wheat evolution and domestication. In: Ogihara Y., Takumi S., Handa H. (Eds) *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Tokyo: Springer, 2015b: 83-89. DOI 10.1007/978-4-431-55675-6_9
- 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*. Ser.: Springer Protocols Handbooks. Berlin; Heidelberg: Springer, 2017;477-494. DOI 10.1007/978-3-662-52959-1_49
- Badaeva E.D., Ruban A.S., Shishkina A.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Surzhikov S.A., Dragovich A.Yu. Genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. ($2n = 4x = 28, U^cU^cX^cX^c$) chromosomes based on FISH analysis and substitution patterns in common wheat × *Ae. columnaris* introgressive lines. *Genome*. 2018;61(2):131-143. DOI 10.1139/gen-2017-0186
- Bariana H.S., McIntosh R.A. Characterisation and origin of rust and powdery mildew resistance genes in VPM1 wheat. *Euphytica*. 1994;76(1):53-61. DOI 10.1007/BF00024020
- 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
- Biodiversity. Facts and figures on food and biodiversity. 2024 [cited 2024, 11 July]. Available from: <https://idrc-crdd.ca/en/research-in-action/facts-figures-food-andbiodiversity>
- Blüthner W.-D., Schubert V., Mettin D. Instability in amphiploids and backcross derivatives of a *Triticum aestivum* × *Ae. caudata* cross. In: Miller T.E., Koebner R.M.D. (Eds) *Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium*. Cambridge, 1988;209-213
- Cabrera A., Friebe B., Jiang J., Gill B.S. Characterization of *Hordeum chilense* chromosomes by C-banding and in situ hybridization using highly repeated DNA probes. *Genome*. 1995;38(3):435-442. DOI 10.1139/g95-057
- Danilova T.V., Akhunova A.R., Akhunov E.D., Friebe B., Gill B.S. Major structural genomic alterations can be associated with hybrid spe-

- ciation in *Aegilops markgrafii* (Triticeae). *Plant J.* 2017;92(2):317-330. DOI 10.1111/tpj.13657
- De Caro S., Venezia A., Di Stasio L., Danzi D., Pignone D., Mamone G., Iakomino G. Tritordeum: promising cultivars to improve health. *Foods.* 2024;13(5):661. DOI 10.3390/foods13050661
- Delibes A., Lopez-Braña I., Mena M., García-Olmedo F. Genetic transfer of resistance to powdery mildew and of an associated biochemical marker from *Aegilops ventricosa* to hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1987;73(4):605-608. DOI 10.1007/BF00289201
- Delibes A., Doussinault G., Mena M., López-Braña I., García-Olmedo F. Eyespot resistance gene *Pch-1* from *Aegilops ventricosa* is associated with a different chromosome in wheat line H-93-70 than the resistance factor in "Roazon" wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1988;76(4):573-576. DOI 10.1007/BF00260911
- Dhaliwal H.S., Friebe B., Gill K.S., Gill B.S. Cytogenetic identification of *Aegilops squarrosa* chromosome additions in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1990;79(6):769-774. DOI 10.1007/BF00224243
- Dosba F., Doussinault G. Obtention of wheat lines with favorable agronomical characteristics of *Aegilops ventricosa*. *Ann. Amelior. Plant.* 1978;28(1):27-44
- Dosba F., Tanguy A.M., Rivoal R. Extraction, identification and utilization of the addition lines *T. aestivum* - *Ae. ventricosa*. In: Ramanujan S. (Ed.) Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium, 23-28 Febr. New Delhi, 1978;332-337
- Dubcovsky J., Dvořák J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science.* 2007;316(5833):1862-1866. DOI 10.1126/science.1143986
- Dvořák J., Luo M.C., Yang Z.L., Zhang H.B. The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97(4):657-670. DOI 10.1007/s001220050942
- Dvořák J., Deal K.R., Luo M.C. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors. *Genetics.* 2006;174(1):17-27. DOI 10.1534/genetics.106.058115
- Endo T.R., Tsunewaki K. Sterility of common wheat with *Aegilops triuncialis* cytoplasm. *Heredity.* 1975;66(1):13-18. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a108562
- Feldman M. Origin of cultivated wheat. In: Bonjean A.P., Angus W.J. (Eds) The World Wheat Book: A history of wheat breeding. London: Intersept Ltd, 2001;3-56
- Feldman M., Levy A.A. Wheat Evolution and Domestication. Springer: Cham, 2023. DOI 10.1007/978-3-031-30175-9
- Fernández J.A., Jouve N. Giemsa C-banding of the chromosomes of *Hordeum chilense* and its amphiploid \times *Triticum turgidum* conv. *durum*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung = J. Plant Breed.* 1984;93(3):212-221. DOI 10.1007/BF00032990
- Friebe B., Schubert V., Blüthner W.D., Hammer K. C-banding pattern and polymorphism of *Aegilops caudata* and chromosomal constitutions of the amphiploid *T. aestivum* - *Ae. caudata* and six derived chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 1992;83(5):589-596. DOI 10.1007/BF00226902
- Friebe B., Jiang J., Tuleen N., Gill B.S. Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the characterization of derived chromosome addition and translocation lines in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1995a;90(1):150-156. DOI 10.1007/BF00221010
- Friebe B., Tuleen N.A., Gill B.S. Standard karyotype of *Triticum searsii* and its relationship with other S-genome species and common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1995b;91(2):248-254. DOI 10.1007/BF00220885
- Friebe B., Badaeva E.D., Hammer K., Gill B.S. Standard karyotypes of *Aegilops uniaristata*, *Ae. mutica*, *Ae. comosa* subspecies *comosa* and *heldreichii* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1996a;202(3):199-210. DOI 10.1007/BF00983382
- 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.* 1996b;91(1):59-87. DOI 10.1007/BF00035277
- Friebe B., Qi L.L., Nasuda S., Zhang P., Tuleen N.A., Gill B.S. Development of a complete set of *Triticum aestivum*-*Aegilops speltoides* chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101(1):51-58. DOI 10.1007/s001220051448
- García-Olmedo F., Delibes A., Sanchez-Monge R. Transfer of resistance to eyespot disease from *Aegilops ventricosa* to wheat. In: Breeding for Disease Resistance and Oat Breeding: Proceedings of the EUCARPIA Cereal Section Meeting, 28 Feb.-1 Mar. Weihenstephan, 1984;6:156-168
- Gill B.S., Kimber G. The Giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974;71(4):1247-1249. DOI 10.1073/pnas.71.4.1247
- Gill B.S., Raupp W.J., Sharma H.C., Browder L.E., Hatchett J.H., Harvey T.L., Moseman J.G., Waines J.G. Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and Hessian fly. *Plant Dis.* 1986;70:553-556. DOI 10.1094/PD-70-553
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome.* 1991;34(5):830-839. DOI 10.1139/g95-030
- Girma E. Genetic erosion of wheat (*Triticum* spp.): concept, research results and challenges. *J. Nat. Sci. Res.* 2017;7(23):72-81
- Gong W., Han R., Li H., Song J., Yan H., Li G., Liu A., Cao X., Guo J., Zhai S., Cheng D., Zhao Z., Liu C., Liu J. Agronomic traits and molecular marker identification of wheat-*Aegilops caudata* addition lines. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1743. DOI 10.3389/fpls.2017.01743
- Grewal S., Othmeni M., Walker J., Hubbart-Edwards S., Yang C.-y., Scholefield D., Ashling S., Isaac P., King I.P., King J. Development of wheat-*Aegilops caudata* introgression lines and their characterization using genome-specific KASP markers. *Front. Plant Sci.* 2020;11:606. DOI 10.3389/fpls.2020.00606
- Hirosawa S., Takumi S., Ishii T., Kawahara T., Nakamura C., Mori N. Chloroplast and nuclear DNA variation in common wheat: insight into the origin and evolution of common wheat. *Genes Genet. Syst.* 2004;79(5):271-282. DOI 10.1266/ggs.79.271
- Huang D.-h., Lin Z.-s., Chen X., Zhang Z.-y., Chen C.-c., Cheng S.-h., Xin Z.-y. Molecular characterization of a *Triticum durum*-*Haynaldia villosa* amphiploid and its derivatives for resistance to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Agricult. Sci. China.* 2007;6(5):513-521. DOI 10.1016/S1671-2927(07)60077-7
- Iqbal N., Reader S.M., Caligari P.D.S., Miller T.E. Characterization of *Aegilops uniaristata* chromosomes by comparative DNA marker analysis and repetitive DNA sequence in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 2000a;101(8):1173-1179. DOI 10.1007/s001220051594
- Iqbal N., Reader S.M., Caligari P.D.S., Miller T.E. The production and characterization of recombination between chromosome 3N of *Aegilops uniaristata* and chromosome 3A of wheat. *Heredity.* 2000b;84(4):487-492. DOI 10.1046/j.1365-2540.2000.00706.x
- Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Incorporation of barley chromosomes into wheat. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.) Wheat. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin: Springer, 1990;128-151. DOI 10.1007/978-3-662-10933-5_8
- Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics.* 2002;160(4):1651-1659. DOI 10.1093/genetics/160.4.1651
- Kihara H. Origin of cultivated plants with special reference to wheat. *Seiken Zihō.* 1975;25/26:1-24
- King I.P., Miller T.E., Koebner R.M.D. Determination of the transmission frequency of chromosome 4S¹ of *Aegilops sharonensis* in a range of wheat genetic backgrounds. *Theor. Appl. Genet.* 1991;81(4):519-523. DOI 10.1007/BF00219443
- King J., Grewal S., Yang C.-y., Hubbart S., Scholefield D., Ashling S., Edwards K.J., Allen A.M., Burridge A., Bloor C., Davassi A., da Silva G.J., Chalmers K., King I.P. A step change in the transfer of interspecific variation into wheat from *Amblyopyrum muticum*. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15(2):217-226. DOI 10.1111/pbi.12606
- King J., Grewal S., Yang C.-y., Hubbart E.S., Scholefield D., Ashling S., Harper J.A., Allen A.M., Edwards K.J., Burridge A.J., King I.P. Introgression of *Aegilops speltoides* segments in *Triticum aestivum*

- and the effect of the gametocidal genes. *Ann. Bot.* 2018;121(2):229-240. DOI 10.1093/aob/mcx149
- King J., Newell C., Grewal S., Hubbard-Edwards S., Yang C.-y., Scholefield D., Ashling S., Stride A., King I.P. Development of stable homozygous wheat/*Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*) introgression lines and their cytogenetic and molecular characterization. *Front. Plant Sci.* 2019;10:34. DOI 10.3389/fpls.2019.00034
- Kishii M. An update of recent use of *Aegilops* species in wheat breeding. *Front. Plant Sci.* 2019;10:585. DOI 10.3389/fpls.2019.00585
- Kumar A., Kapoor P., Chunduri V., Sharma S., Garg M. Potential of *Aegilops* sp. for improvement of grain processing and nutritional quality in wheat (*Triticum aestivum*). *Front. Plant Sci.* 2019;10:308. DOI 10.3389/fpls.2019.00308
- Levy A.A., Feldman M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biol. J. Linn. Soc.* 2004; 82(4):607-613. DOI 10.1111/j.1095-8312.2004.00346.x
- Li G., Zhang T., Yu Z., Wang H., Yang E., Yang Z. An efficient Oligo-FISH painting system for revealing chromosome rearrangements and polyploidization in Triticeae. *Plant J.* 2020;105(4):978-993. DOI 10.1111/TPJ.15081
- Linc G., Friebe B.R., Kynast R.G., Molnar-Lang M., Kőszegi B., Sutka J., Gill B.S. Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* Host. *Genome.* 1999;42(3):497-503. DOI 10.1139/gen-42-3-497
- Linc G., Sepsí A., Molnar-Lang M. A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome. *Cytogenet. Genome Res.* 2012;136(2):138-144. DOI 10.1159/000334835
- Liu C., Li G.-R., Sehgal K.S., Jia J.-Q., Yang Z.-J., Friebe B., Gill B.S. Genome relationships in the genus *Dasypyrum*: evidence from molecular phylogenetic analysis and in situ hybridization. *Plant Syst. Evol.* 2010;288(3-4):149-156. DOI 10.1007/s00606-010-0319-9
- Liu C., Li G.-R., Gong W.-P., Li G.-Y., Han R., Li H.-S., Song J.-M., Liu A.-F., Cao X.-Y., Chu X.-S., Yang Z.-J., Huang C.-Y., Zhao Z.-D., Liu J.-J. Molecular and cytogenetic characterization of a powdery mildew-resistant wheat-*Aegilops mutica* partial amphiploid and addition line. *Cytogenet. Genome Res.* 2015;147(2-3):186-194. DOI 10.1159/000443625
- Logojan A.A., Molnár-Láng M. Production of *Triticum aestivum* - *Aegilops biuncialis* chromosome additions. *Cereal Res. Commun.* 2000;28(3):221-222. DOI 10.1007/BF03543597
- Luo M.-C., Yang Z.-L., You F.M., Kawahara T., Waines J.G., Dvořák J. The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114(6):947-959. DOI 10.1007/s00122-006-0474-0
- Mahmood Y.A., DeSilva J., King I.P., King J., Foulkes M.J. Leaf photosynthesis traits and associations with biomass and drought tolerance in amphidiploid and ancestral wheat genotypes. *Eur. J. Agronomy.* 2023;147:126846. DOI 10.1016/j.eja.2023.126846
- Martín A., Cabrera A. Cytogenetics of *Hordeum chilense*: current status and considerations with reference to breeding. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1-3):378-384. DOI 10.1159/000082423
- Martin A., Sanchez-Mongelaguna E. Cytology and morphology of the amphiploid *Hordeum chilense* × *Triticum turgidum* conv. *durum*. *Euphytica.* 1982;31(1):261-268. DOI 10.1007/BF00028329
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubkovsky G., Rogers J., Morris C.F., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. The 12th International Wheat Genetics Symposium, 8–13 Sept. 2013. Yokohama, Japan, 2013
- Miller T.E., Hutchinson J., Chapman V. Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1982;61(1):27-33. DOI 10.1007/BF00261506
- Miller T.E., Reader S.M., Mahmood A., Purdie K.A., King I.P. Chromosome 3N of *Aegilops uniaristata* – a source of tolerance to high levels of aluminium for wheat. In: Li S., Xin Z.Y. (Eds) Proceeding of the 8th International Wheat Genetics Symposium, 20–25 July 1993. Beijing: China Agric. Sci. Press, 1995;1037-1042
- Millet E., Manisterski J., Ben-Yehuda P., Distelfeld A., Deek J., Wan A., Chen X., Steffenson B.J. Introgression of leaf rust and stripe rust resistance from Sharon goatgrass (*Aegilops sharonensis* Eig) into bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome.* 2014;57(6):309-316. DOI 10.1139/gen-2014-0004
- Minelli S., Ceccarelli M., Mariani M., De Pace C., Cioninia P.G. Cytogenetics of *Triticum* × *Dasypyrum* hybrids and derived lines. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1-3):385-392. DOI 10.1159/000082424
- Molnár I., Vrána J., Burešová V., Cápál P., Farkas A., Darkó É., Cseh A., Kubaláková M., Molnár-Láng M., Doležel J. Dissecting the U, M, S and C genomes of wild relatives of bread wheat (*Aegilops* spp.) into chromosomes and exploring their synteny with wheat. *Plant J.* 2016;88(3):452-467. DOI 10.1111/tpj.13266
- Molnár-Láng M., Linc G., Logojan A., Sutka J. Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) × winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome.* 2000;43(6):1045-1054. DOI 10.1139/gen-43-6-1045
- Molnár-Láng M., Molnár I., Szakács É., Linc G., Bedő Z. Production and molecular cytogenetic identification of wheat-alien hybrids and introgression lines. In: Tuberosa R., Graner A., Frison E. (Eds) Genomics of Plant Genetic Resources. Vol. 1. Managing, Sequencing and Mining Genetic Resources. New York: Springer, 2014;255-284
- Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. (Eds) Alien Introgression in Wheat. Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics. Switzerland: Springer, 2015. DOI 10.1007/978-3-319-23494-6
- Monneveux P., Zaharieva M., Rekika D. The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. In: Royo C., Nachit M., Di Fonzo N., Araus J.L. (Eds) Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges. Zaragoza: Ciheam, 2000;71-81
- Olivera P.D., Steffenson B.J. *Aegilops sharonensis*: origin, genetics, diversity, and potential for wheat improvement. *Botany.* 2009;87(8): 740-756. DOI 10.1139/B09-040
- Olivera P.D., Rouse M.N., Jin Y. Identification of new sources of resistance to wheat stem rust in *Aegilops* spp. in the tertiary gene pool of wheat. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1719. DOI 10.3389/fpls.2018.01719
- Özkan H., Levy A.A., Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell.* 2001;13(8):1735-1747. DOI 10.1105/tpc.13.8.1735
- Pace C.D., Vaccino P., Cionini P.G., Pasquini M., Bizzarri M., Qualset C.O. *Dasypyrum*. In: Cole C. (Ed.) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Cereals. Berlin: Springer, 2011; 185-292
- Peng J.H., Sun D., Nevo E. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Mol. Breed.* 2011;28(3):281. DOI 10.1007/s11032-011-9608-4
- Prieto P., Martín A., Cabrera A. Chromosomal distribution of telomeric and telomeric-associated sequences in *Hordeum chilense* by in situ hybridization. *Hereditas.* 2004;141(2):122-127. DOI 10.1111/j.1601-5223.2004.01825.x
- Prohens J., Gramazio P., Plazas M., Dempewolf H., Kilian B., Díez M.J., Fita A., Herraiz F.J., Rodríguez-Burruezo A., Soler S., Knapp S., Vilanova S. Introgressomics: a new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change. *Euphytica.* 2017;213(7):158. DOI 10.1007/s10681-017-1938-9
- 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): 102-109. DOI 10.1007/BF02732107
- Said M., Holušová K., Farkas A., Ivanizs L., Gaál E., Cápál P., Abrouk M., Martis-Thiele M.M., Kalapos B., Bartoš J., Friebe B., Doležel J., Molnár I. Development of DNA markers from physically mapped loci in *Aegilops comosa* and *Aegilops umbellulata* using single-gene FISH and chromosome sequences. *Front. Plant Sci.* 2021;12:1136. DOI 10.3389/fpls.2021.689031
- Said M., Gaál E., Farkas A., Molnár I., Bartoš J., Doležel J., Cabrera A., Endo T.R. Gametocidal genes: from a discovery to the application in

- wheat breeding. *Front. Plant Sci.* 2024;15:1396553. DOI 10.3389/fpls.2024.1396553
- Schneider A., Molnár I., Molnár-Láng M. Utilisation of *Aegilops* (goat-grass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*. 2008;163(1):1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y
- Schulz-Schaeffer J., Friebe B. Karyological characterization of a partial amphiploid, *Triticum turgidum* L. var. *durum* × *Agropyron intermedium* (Host) P.B. *Euphytica*. 1992;62(2):83-88. DOI 10.1007/BF00037932
- Sharma M., Punya, Gupta B.B. Role of wild relatives for development of climate-resilient varieties. In: Salgotra R.K., Zargar S.M. (Eds) Rediscovery of Genetic and Genomic Resources for Future Food Security. Singapore: Springer, 2020;303-314. DOI 10.1007/978-981-15-0156-2_11
- Sharma S., Schulthess A.W., Bassi F.M., Badaeva E.D., Neumann K., Graner A., Özkan H., Werner P., Knüpffer P., Kilian B. Introducing beneficial alleles from plant genetic resources into the wheat germplasm. *Biology*. 2021;10(10):982. DOI 10.3390/biology10100982
- Siddiqui K. Induced mutations in *Triticum aegilopoides*, *Aegilops ventricosa* and their synthetic allopolyploid. *Hereditas*. 2009;73:45-50. DOI 10.1111/j.1601-5223.1973.tb01066.x
- Siddiqui K., Ingversen J., Køie B. Inheritance of protein patterns in a synthetic allopolyploid of *Triticum monococcum* (AA) and *Aegilops ventricosa* (DDM^VMM^V). *Hereditas*. 2009;72:205-214. DOI 10.1111/j.1601-5223.1972.tb01044.x
- Tadesse W., Amri A., Ogbonnaya F.C., Sanchez-Garcia M., Sohail Q., Baum M. Wheat. In: Singh M., Upadhyaya H.D. (Eds) Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement. San Diego: Acad. Press, 2016;81-124
- Tanguy A.-M., Coriton O., Abélard P., Dedryver F., Jahier J. Structure of *Aegilops ventricosa* chromosome 6N^V, the donor of wheat genes *Yr17*, *Lr37*, *Sr38*, and *Cre5*. *Genome*. 2005;48(3):541-546. DOI 10.1139/g05-001
- Tsujimoto H., Tsunewaki K. Gametocidal genes in wheat and its relatives. I. Genetic analyses in common wheat of a gametocidal gene derived from *Aegilops speltoides*. *Can. J. Genet. Cytol.* 1984;26(1):78-84. DOI 10.1139/g84-013
- Tsujimoto H., Tsunewaki K. Gametocidal genes in wheat and its relatives. III. Chromosome location and effects of two *Aegilops speltoides*-derived gametocidal genes in common wheat. *Genome*. 1988;30(2):239-244. DOI 10.1139/g88-041
- Tsunewaki K. Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. In: Jauhar P.P. (Ed.) Methods of Genome Analysis in Plant: Their Merits and Pitfalls. Boca Ration: CRC Press, 1996;271-299.
- Wang J., Luo M.-C., Chen Z., You F.M., Wei Y., Zheng Y., Dvorak J. *Aegilops tauschii* single nucleotide polymorphisms shed light on the origins of wheat D-genome genetic diversity and pinpoint the geographic origin of hexaploid wheat. *New Phytologist*. 2013;198(3):925-937. DOI 10.1111/nph.12164
- Zhang P., Dundas I.S., McIntosh R.A., Xu S.S., Park R.F., Gill B.S., Friebe B. Wheat–*Aegilops* introgressions. In: Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. (Eds) Alien Introgression in Wheat. Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics. Switzerland: Springer, 2015;221-244. DOI 10.1007/978-3-319-23494-6
- Zhang W., Zhang R., Feng Y., Bie T., Chen P. Distribution of highly repeated DNA sequences in *Haynaldia villosa* and its application in the identification of alien chromatin. *Chin. Sci. Bull.* 2013;58(8):890-897. DOI 10.1007/s11434-012-5598-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.07.2024. После доработки 01.08.2024. Принята к публикации 07.08.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-81

Потенциал коллекции амаранта ВИР в свете мировых тенденций использования и селекции

Д.В. Соколова , А.Е. Соловьева , А.М. Зарецкий , Т.В. Шеленга Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
 dianasokol@bk.ru

Аннотация. Амарант – древняя культура семейства Амарантовые (Amaranthaceae). Для России это достаточно новая сельскохозяйственная культура. В семенах и листовой биомассе содержатся высококачественный безглютеновый белок, жирные кислоты, полиненасыщенный углеводород сквален, флавоноиды, витамины и минералы. Комплексное изучение амаранта, развитие его селекции и создание новых сортов являются крайне важным направлением для решения проблемы повышения качества пищевой продукции путем использования растительного сырья, обогащенного полезными и высокопитательными компонентами. На сегодняшний день основными методами селекционной работы с амарантом остаются отбор и гибридизация. Методы мутационной селекции и полиплоидии были успешно использованы для увеличения урожайности семян и содержания белка. С помощью генов, кодирующих белки амаранта, созданы трансгенные растения картофеля, мягкой пшеницы и кукурузы. Несмотря на большой потенциал амаранта, изучению его геномики посвящено не много исследований, направленных главным образом на идентификацию видового разнообразия. В направления селекционной работы с амарантом входят такие признаки, как «крупность и неосыпаемость семян», «низкорослость», «скороспелость», «высокая урожайность», «холодостойкость», «синхронность созревания», «устойчивость к вредителям и болезням», «высокая питательная ценность»: содержание и качество белка, липидов, сквалена, биологически активных соединений. Уникальная коллекция амаранта Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) включает 570 образцов из различных стран мира. На протяжении 70 лет она пополнялась местными, селекционными сортами и дикими видами за счет экспедиций, поступлений из научно-исследовательских институтов, ботанических садов, генбанков и опытных селекционных станций всего мира. В результате многолетнего изучения были сформированы признаковые группы образцов с высокой урожайностью семян и листовой биомассы, скороспелые и холодостойкие, с повышенным содержанием белка в семенах и биомассе, низкорослые, устойчивые к осыпанию семян, овощного и декоративного направления использования. Сохраняемый в ВИР генофонд амаранта способен предоставлять неограниченные возможности для селекции и восполнять нужды населения страны, обогащая питательный рацион продуктами из этой здоровой и полезной культуры.

Ключевые слова: *Amaranthus* L.; ценные признаки; направления селекции; видовое разнообразие; коллекция амаранта ВИР.

Для цитирования: Соколова Д.В., Соловьева А.Е., Зарецкий А.М., Шеленга Т.В. Потенциал коллекции амаранта ВИР в свете мировых тенденций использования и селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):731-743. DOI 10.18699/vjgb-24-81

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 24-26-00218 от 29.12.2023).

The potential of the amaranth collection maintained at VIR in the context of global plant breeding and utilization trends

D.V. Sokolova , A.E. Solovieva , A.M. Zaretsky , T.V. Shelenga Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
 dianasokol@bk.ru

Abstract. Amaranth is an ancient crop of the family Amaranthaceae, but it is fairly new to Russia. Its seeds and leaf biomass contain a high-quality gluten-free protein, fatty acids, squalene (a polyunsaturated hydrocarbon), flavonoids, vitamins, and minerals. A comprehensive study of amaranth, enhancement of its breeding, and development of new cultivars will contribute to food quality improvement through the use of plant raw materials enriched for wholesome and highly nutritious components. At present, selection and hybridization still remain the main amaranth breeding techniques. Meanwhile, mutation breeding and polyploidy have been successfully employed to increase its seed yield and protein content. The genes encoding amaranth proteins have been used to produce transgenic plants of potato,

bread wheat, and maize. Despite the great potential of amaranth, little research has been dedicated to the study of its genomics, concentrating mainly on the identification of its species diversity. Targets of breeding practice for amaranth include such characteristics as large size and nonshattering of seeds, short stem, earliness, high yield, cold hardiness, synchronized maturation, resistance to pests and diseases, and high nutritional value, including the content and quality of protein, lipids, squalene, and bioactive compounds. A unique collection of amaranth maintained at the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) currently incorporates 570 accessions from various countries. For 70 years it has been replenished with local varieties, commercial cultivars, and wild species supplied by collecting missions, research centers, botanical gardens, genebanks, and experimental breeding stations from all over the world. Long-standing studies have resulted in the formation of trait-specific groups of accessions, with high yields of seeds and leaf biomass, earliness, cold hardiness, high protein content in seeds and biomass, short stems, and resistance to seed shattering, earmarked for vegetable or ornamental purposes. The gene pool of amaranth preserved at VIR can provide unlimited opportunities for breeding and meet the needs of the country's population, enriching the human diet with ingredients produced from such a health-friendly and useful crop.

Key words: *Amaranthus* L.; valuable traits; breeding trends; species diversity; VIR's amaranth collection.

For citation: Sokolova D.V., Solovieva A.E., Zaretsky A.M., Shelenga T.V. The potential of the amaranth collection maintained at VIR in the context of global plant breeding and utilization trends. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):731–743. DOI 10.18699/vjgb-24-81

Введение

Индустриализация сельского хозяйства и консолидация единого мирового рынка обеспечили устойчивый рост поставок продовольствия во всем мире за счет повышения урожайности. В то же время комплекс инновационных процессов в сельском хозяйстве, базирующийся на селекции высокоурожайных сортов важнейших культур и развитии аграрных технологий, затронул лишь часть из них: сою, пшеницу, рис, кукурузу, подсолнечник. Это привело к сужению агробиоразнообразия и постепенному замещению маловажных культур, что создает потенциальную угрозу глобальной продовольственной безопасности (Khoury et al., 2014; Dawson et al., 2019). Хотя эти культуры содержат достаточно калорий, им не хватает незаменимых аминокислот, минералов и витаминов для полноценного сбалансированного питания человека, что приводит к «скрытому» недоеданию более двух миллиардов человек в мире, ежедневная диета которых практически полностью состоит из вышеперечисленных культур (Cheng et al., 2015).

Человечество в течение своего существования использовало около 3000 видов растений, и только около 150 из них выращивается в коммерческих посевах (Mangelsdorf, 1966). По другим данным, во всем мире съедобны около 30000 видов растений, но только 7000 из них используются в пищу (Ramdwar et al., 2017). Диверсификация источников продовольствия за счет интеграции широкого спектра «забытых» культур может улучшить качество питания населения многих стран и гарантировать их продовольственную безопасность (Mayes et al., 2011; Ebert, 2014; Joshi et al., 2018).

Амарант – одна из культур, обладающая потенциалом для того, чтобы стать альтернативной зерновой культурой на мировом уровне (Das, 2016). Цель настоящего исследования – исторический обзор селекционной работы с данной культурой и характеристика генетического разнообразия коллекции амаранта ВИР, являющейся потенциалом для отечественной селекции.

Амарант – древняя культура, принадлежащая к семейству *Amaranthaceae* порядка *Caryophyllales* и подсемейству *Amaranthoideae*. Род *Amaranthus* L., насчитывающий, по разным данным, от 60 до 87 видов, входит в десятку наи-

более сложных в таксономическом отношении культур. Наряду с гречихой и киноа, он является представителем немногочисленной группы «псевдозлаковых» растений (Saunders, Becker, 1984; Teutonico, Knorr, 1985).

Большинство видов амаранта – дикие и сорные. Зерновыми видами амаранта считаются *Amaranthus cruentus* и *A. hypochondriacus*, берущие свое начало из Центральной и Северной Америки, а также *A. caudatus* южноамериканского происхождения (Covas, 1993). История возделывания амаранта на этих территориях насчитывает 5000–7000 лет. По данным археологических записей о собранных на северо-западе Аргентины материалах, возраст найденных семян был датирован началом середины периода голоцена (5.5–6 тыс. лет до нашей эры). Наиболее древние находки амаранта обнаружены в пещере высокогорного участка Пеньяс-де-ла-Крус департамента Антофагаста-де-ла-Сьерра (3665 м над уровнем моря). Эти данные указывают на значительно более раннее употребление амаранта – 10000 и 7000 лет до нашей эры (Arreguez et al., 2013).

Амарант был очень важным источником питания и для населения территории Южной Америки в доиспанские времена (Chagaray, 2005). Племена ацтеков и майя использовали его с древнейших времен в качестве зерновой культуры, уступающей по своему значению лишь кукурузе и бобовым (Sauer, 1967; Smith M.E., 1996). Листья амаранта также употребляли в пищу. Были распространены смешивание цельных или молотых зерен из амаранта для приготовления хлеба, каш и лепешек, а также церемониальное использование в храмах. Ацтеки лепили из амарантового теста маленькие фигурки богов и съедали их во время ритуалов (De Montellano, 1990). Вероятнее всего, именно этот факт в начале XVI в. послужил причиной строгого запрета испанскими завоевателями употребления и выращивания амаранта, что привело к его забвению на долгие годы (Saunders, Becker, 1984).

Возрождение интереса к амаранту в конце XX в. связано с работами по изучению его уникальных биохимических характеристик, универсального применения и типичному для амаранта механизму C4-фотосинтеза (Venskutonis, Kraujalis, 2013; Магомедов, Чиркова, 2015). Для Российской Федерации – это достаточно новая сельскохозяйственная культура, обладающая огромным потенциалом

интенсивности роста, продуктивности и высоким содержанием в семенах и листовой биомассе полноценного белка (Кононков и др., 1999). Поэтому комплексное изучение амаранта, развитие его селекции и создание новых сортов – крайне важное направление для решения проблемы повышения качества пищевой продукции путем использования растительного сырья, обогащенного полезными и высокопитательными компонентами.

Классификация рода *Amaranthus* затруднена из-за отсутствия видовых и качественных определяющих признаков, широкого диапазона фенотипической изменчивости между видами, а также интрогрессии и гибридизации между сорными и культурными видами (Sauer, 1967; Naupli, Jain, 1978). Многие исследователи оценивали уровень межвидовой филогенетической взаимосвязи с использованием морфологических, биохимических, молекулярных и цитогенетических методов (Murray, 1940; Costea et al., 2001; Das, 2012; Akin-Idowu et al., 2016). Большинство ученых сходится во мнении, что все зерновые амаранты произошли от прародителя сорняков *A. hybridus*.

Культивируемые зерновые виды близкородственны, однако *A. hypochondriacus* ($2n = 32$) и *A. caudatus* ($2n = 32$) более тесно связаны друг с другом, чем с *A. cruentus* ($2n = 34$). Особенностью *A. cruentus* является наличие одной копии хромосомы 2, приводящей к гаплоидному набору $n = 17$ (Singh et al., 2023).

Основная часть представителей рода *Amaranthus* – однолетние травянистые растения с бордовой или желто-зеленой расцветкой листьев и соцветий. Анатомо-морфологическое разнообразие амаранта связано с конкретным видом и условиями произрастания. Высота растений варьирует от 40 см до 5 м. Стебель, как правило, прямостоячий, бороздчатый, сильно облиственный. У некоторых видов встречается раскидистая полуприжатая форма. По степени ветвления растений различают слабо-, средне- и сильноветвистые. Габитус формируется из совокупности признаков положения и ветвления главного стебля и его размеров, формы соцветия. Листья без прилистников, имеют очередное или супротивное расположение, различаются по форме листа и края. Среднее число листьев на растении может достигать 250, при этом площадь листовой поверхности составляет около 7500–8000 см². Соцветие – сложная метелка разной формы, плотности и цвета. Цветки мелкие, актиноморфные, раздельнополые, реже обоеполые, собранные в пазухах листьев. Андроец состоит из 5 тычинок, гинецей – из 3, реже 4, плодolistиков. Завязь верхняя, одногнездная (Das, 2016).

Амарант считается «суперпродуктом» благодаря его нутрицевтической ценности: содержанию высококачественного безглютенового белка, ненасыщенных жирных кислот, пищевых волокон, флавоноидов, витаминов (тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота, никотиновая кислота) и минералов (кальций, магний и медь, а также натрий, железо, фосфор, цинк) (Кононков и др., 1999; Grobelenk-Mlakar et al., 2009; Palombini et al., 2013; Joshi et al., 2018; Soriano Garcia et al., 2018; Sokolova et al., 2021). В семенах содержится метионин (15.8 мг/г общего белка) и лизин (55.8 мг/г общего белка), что обеспечивает его высокую пищевую ценность по сравнению с большинством злаков (Tang, Tsao, 2017).

Количество липидов в семенах амаранта сильно варьируется в зависимости от вида и генотипа и колеблется в пределах 1.9–9.7 %. Пальмитиновая, олеиновая и линолевая, а также линоленовая жирные кислоты содержатся в больших количествах и составляют более 90 % общего количества жирных кислот. Масло семян амаранта имеет подтвержденный терапевтический эффект.

Хотя состав жирных кислот амаранта сходен с маслом злаков, он отличается тем, что содержит относительно высокие уровни полиненасыщенного углеводорода сквалена (C₃₀H₅₀) (Bressani, 1994). Сквален имеет широкое применение в медицине: в качестве адьюванта в вакцинах, иммуномодулятора и антиоксиданта – в комплексной терапии ряда заболеваний, таких как диабет и ишемическая болезнь, а также в составе косметических средств (Гонор и др., 2006; Huang et al., 2009). Существуют убедительные данные, что сквален снижает риск развития онкологических заболеваний и уровень холестерина у человека (Miettinen, Vanhanen, 1994; Rao et al., 1998; Smith T.J., 2000). Возрастающий интерес к этому веществу объясняется сочетанием в нем комплекса терапевтических эффектов: антиоксидантного, гиполипидемического, антитоксического и антидиабетического (Магомедов и др., 2017).

Использование амаранта

По способу использования культивируемые виды амаранта подразделяют на две основные группы – пищевую (овощные и зерновые) и кормовую, а также менее известные – декоративную, фармацевтическую и в производстве строительных материалов (рис. 1). Такое деление достаточно условно, так как один и тот же сорт может проявлять себя и как кормовой, и как зерновой, а в молодом возрасте листья всех видов амаранта можно употреблять свежими в виде салатов (Ruth et al., 2021; Sokolova et al., 2021).

Изначально культуру возделывали для получения используемых в пищу семян (Центральная и Южная Америка, горные районы Азии) и как зеленую овощную культуру (Африка, Южная и Юго-Восточная Азия). Употребление человеком овощных видов амаранта широко распространено в Индии и странах Азии и Юго-Восточной Азии, а также в африканских странах, но мало известно в странах Северной и Южной Америки.

Листья, побеги и сочные нежные стебли овощных амарантов употребляются в супах, овощных рагу. Молодые листья зернового амаранта также используются как листовые овощи. Бордовоокрашенные листья *A. cruentus* являются сырьем для производства чая, обогащенного амарантином. Семена амаранта используют как в целом (каши, хлопья, сладости), так и в перемолотом виде (хлеб, макароны, выпечка) (Das, 2016).

Амарантовое масло экстрагируют главным образом из семян двух видов: *A. cruentus* и *A. hypochondriacus*, содержание у которых варьирует в пределах 4.8–8.1 % (He, Corke, 2003; Gamel et al., 2007). Выход масла у амаранта превышает большинство зерновых культур, но уступает масличным (Ayorinde, 1989; Leon-Camacho et al., 2001). Н.Р. Хе и Н. Corke (2003) исследовали содержание масла у 104 образцов 30 видов амаранта. Было установлено значительное варьирование этого показателя в зависимости от конкретного генотипа, места выращивания и влияния



Рис. 1. Направления использования амаранта.

абиотических факторов. Причем дикие формы не уступали культурным по этому показателю, подтверждая свою ценность для селекции (табл. 1).

Кормовое направление связано с использованием надземной биомассы растений. Однако богатые белком семена амаранта также включают в кормовые смеси. Урожайность зеленой биомассы в среднем составляет 85–103 т/га, при выходе сухого вещества 15.7–16.7 т/га (Abbasi et al., 2012; Shadi et al., 2020). В северных регионах Китая урожайность сортов вида *A. hypochondriacus* может достигать 130 т/га, при выходе сухого вещества – 20 т/га (Sun G.Q. et al., 2017). Н. Shadi с коллегами (2020) сообщали, что, по сравнению с кукурузным силосом, амарантовый силос имеет больший уровень переваримого неразлагаемого белка, что делает его использование более эффективным. Высокое содержание сырого белка и низкое содержание лигнина, низкие уровни нитратов и щавелевой кислоты определяют высокий потенциал силоса из амаранта в качестве корма для жвачных животных (Sleugh et al., 2001; Rezaei et al., 2009). Но листовая биомасса амаранта включает антипитательные вещества, такие как ингибиторы трипсина, сапонины, алкалоиды и оксалаты, что снижает ее питательную ценность и требует селекционной проработки в этом направлении (Cheeke et al., 1981).

Таблица 1. Содержание масла и сквалена в семенах разных видов амаранта, по данным (He, Corke, 2003)

Вид	Масло, %	Сквален, мг/г семян
<i>A. rudis</i>	8.25	4.75
<i>A. blitum</i>	6.96	2.93
<i>A. spinosus</i>	6.45	1.89
<i>A. powelli</i>	6.15	2.66
<i>A. retroflexus</i>	5.79	2.46
<i>A. albus</i>	5.68	2.44
<i>A. dubius</i>	5.30	2.03
<i>Amaranthus</i> sp.	5.29	2.56
<i>A. viridis</i>	5.00	2.12
<i>A. hybridus</i>	4.66	2.59
<i>A. hypochondriacus</i>	4.58	2.55
<i>A. tricolor</i>	4.50	2.39
<i>A. cruentus</i>	3.21	1.31

Многие амаранты обладают ярко выраженными декоративными свойствами (Sauer, 1967). Появилось и новое направление – использование одревесневшего главного побега амаранта в строительстве для производства различных древесных плит (Evon et al., 2021).

Агротехника амаранта в наше время сильно отличается от технологий ранних цивилизаций, когда практически не использовались технические средства. Современные агрономические методы механизации позволяют добиться большей урожайности и рентабельности.

Селекция амаранта

Амарант характеризуется генетическим разнообразием и экологической пластичностью. Преимущественно амарант – автогамная культура, но при этом уровень аутбридинга составляет 5–39 %, что достаточно для обеспечения потока генов среди популяций (Hauptli, Jain, 1985). Разнообразный механизм размножения культуры возможен благодаря соотношению и распределению мужских и пестичных цветков в соцветиях. К облигатно аллогамным относятся двудомные виды *A. tuberculatus*, *A. palmeri*, *A. arenicola* и *A. rudis*.

Направления селекционной работы с амарантом зависят от способов его использования. Негативные признаки амаранта, ограничивающие его промышленное выращивание и требующие селекционного улучшения, включают: слишком мелкие семена, большую высоту растения, несинхронное созревание и осыпание семян, размер и жесткость стебля, удерживающего крупное и тяжелое соцветие, его плотную структуру (Kauffman, 1984). Большая высота зернового амаранта (1.8–2.5 м) является отрицательным признаком, затрудняющим уборку урожая. Такие формы склонны к полеганию и требуют поддержки, что приводит к увеличению затрат на выращивание. Внутрисортная вариабельность по высоте растений позволяет вести отбор и скрещивание низкорослых форм.

Селекционная работа с зерновыми амарантами должна проводиться с упором на такие признаки, как «крупность и неосыпаемость семян», «низкорослость», «скоропелость», «высокая урожайность», «холодостойкость», «синхронность созревания», «устойчивость к вредителям и болезням», «высокая питательная ценность», включающая содержание и качество белка, липидов, биологически активных соединений. Для овощных амарантов желательна кустистость, обеспечивающая возможность многократной срезки (Sreelathakumary, Peter, 1993).

Традиционные методы селекции

Отбор

Наибольшее распространение метод получил в США и Индии, где отбор из местных популяций привел к созданию сортов амаранта, используемых по настоящее время. Линии зародышевой плазмы рабочей коллекции Исследовательского центра Родейла (Rodale Research Centre, Пенсильвания, США) являются родоначальниками большинства сортов, созданных в США и Китае (Stallknecht, Schulz-Schaefer, 1993). Первыми зарегистрированными Обществом растениеводства Америки линиями амаранта *A. cruentus* были Montana-3, обладающая белосемянно-

стью и высокой урожайностью, и Montana-5, сочетающая в себе признаки Монтана-3 и одновременность созревания (Schulz-Schaeffer et al., 1989a, b). В дальнейшем методом отбора из Montana-3 в Университете штата Монтана (Montana State University) был получен устойчивый к полеганию сорт амаранта под названием «Amont» (Schulz-Schaeffer et al., 1991). В работе C.S. Kauffman (1992) из Rodale Research Center (США) приведены результаты исследований и успешной селекции зерновых амарантов по нескольким важным признакам: «крупность семян», «синхронность созревания», «повышенное содержание белка в семенах», «устойчивость к осыпанию и вредителям». Там же путем отбора низкорослых форм была создана полукарликовая линия K-432 с высотой растений, не превышающей 92 см.

Путем скрининга местных зерновых образцов из коллекции генетических ресурсов Мексики были отобраны высокоурожайные, среднеспелые и карликовые формы амаранта, пригодные для механизированной уборки (Espitia, 1992). В Перу в университете Cuzco были созданы три известных высокоурожайных сорта *A. caudatus*, которые получили широкое распространение и выращивались в коммерческих целях на сотнях гектаров: Oscar Blanco, Noel Vietmeyer и Alan Garcia. В Кении улучшенная линия образца *A. hypochondriacus* дала свое начало местному сорту Jumla (Kauffman, Weber, 1990; Joshi, Rana, 1991).

Одним из примеров эффективного использования зародышевой плазмы в Индии является создание на региональной станции National Bureau of Plant Genetic Resources (Shimla, Индия) в 1984 г. сорта зернового направления использования Annapurna, который выведен как чистая линия *A. hypochondriacus* из материала местного происхождения (Joshi et al., 1983). Средняя урожайность семян сорта составляет 2/25 т/га, содержание белка 15 %. На этой же станции были получены устойчивый к полеганию, основным болезням и вредителям сорт Durga, скороспелые сорта Gujarat Amaranth-1, Gujarat Amaranth-2, Kapilasa и Suvarna (Raiger, Bhandari, 2012).

В опытах 1977–1988 гг. в Миннесоте (США) максимальная урожайность зерна у перспективных сортов достигала 1.72 т/га (Myers, Putnam, 1988). Современные отечественные сорта показывают урожайность на уровне 2.35 т/га (сорт Каракула), 2.09 т/га (Воронежский) (Государственный реестр..., 2023). Надо отметить, что агротехника амаранта в наше время сильно отличается от более ранних технологий, когда практически не использовались технические средства. Добиться большей урожайности и рентабельности позволяют совместные усилия селекционеров и агротехников.

Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, Россия) скороспелый и холодостойкий сорт амаранта Франт (*A. cruentus*) был получен путем отбора из местной популяции индийского происхождения одностебельных краснолистных форм высотой до 1.2 м, последующего инбридинга и свободного переопыления линейного потомства (Патент, 2022).

Гибридизация

Известно, что гибридизация – наиболее широко используемый и эффективный метод селекции для создания новых комбинаций генов. Одним из первых, кто классифи-

цировал межвидовую гибридизацию внутри рода *Amaranthus*, был M.J. Murray (1940). Он структурировал виды по расположению мужских цветков на соцветиях, провел немало скрещиваний между однодомными и двудомными видами. В исследованиях T.N. Khoshoo и M. Pal (1972) были получены гибриды между *A. hypochondriacus* (в качестве опылителя) и *A. hybridus* и *A. caudatus*. У гибридов F₁ от скрещивания *A. hypochondriacus* × *A. hybridus* уровень фертильности пыльцы оказался наиболее высоким. Большой вклад для понимания доступности генофонда амаранта внесли E.J. Greizerstein и L. Poggio (1992, 1995), исследовавшие мейотическую конфигурацию 13 различных спонтанных гибридов амаранта.

В целом у видов амаранта *A. hypochondriacus* и *A. hybridus* гибридизация наиболее эффективна, так как эти виды близки в эволюционном развитии и содержат одинаковое число хромосом ($2n = 32$). К примеру, путем скрещивания *A. hypochondriacus* с пакистанским образцом *A. hybridus* на Сельскохозяйственной экспериментальной станции Небраски был получен широко распространенный в США урожайный сорт зернового амаранта Plainman (PI 358322), характеризующийся скороспелостью и высокой урожайностью при высоте растений 1.5–1.8 м (Baltensperger et al., 1992).

Посредством гибридизации были переданы полезные признаки, присущие диким видам амаранта. Так, с целью уменьшения осыпания семян селекционным линиям *A. cruentus* и *A. hypochondriacus* были переданы признаки дикого вида *A. powellii*. Гибридизация с диким двудомным видом *A. cannabinus* привела к увеличению размера семян. Устойчивость к гербицидам *A. hybridus* была перенесена в селекционные линии *A. hypochondriacus* и *A. cruentus* (Brenner et al., 2000).

Межвидовая гибридизация зерновых видов амарантов с овощными нередко приводит к гибридам с тератологическими проявлениями, высокой стерильностью пыльцы и хромосомными aberrациями, указывающими на наличие между ними значительного барьера несовместимости (Mohindeen, Irulappan, 1993). При внутривидовой гибридизации *A. hypochondriacus* гетерозисный эффект у потомства не обнаружен. Такой же результат был получен при скрещивании представителей вида *A. cruentus*. Однако при межвидовых скрещиваниях *A. cruentus* с *A. hypochondriacus* отмечался гетерозис, приводящий к достоверному увеличению листовой биомассы у потомства (Lehmann et al., 1991). M.G. Stetter с коллегами (2016) разработали эффективный метод получения внутри- и межвидовых гибридов амаранта, включающий погружение соцветий в водяную баню с температурой 45 °C в течение 10 мин для кастрации мужских цветков, а также SNP-маркеры для их идентификации.

Мужская стерильность – репродуктивная недостаточность у некоторых растений, при которой мужские органы в цветках-гермафродитах не функциональны и производят нежизнеспособные пыльцевые зерна. Ее широко используют в селекционной работе, а также для коммерческого производства гибридов. Для амарантов цитоплазматическая мужская стерильность (CMS) – редкое явление, идентифицированное только у одного вида, *A. hypochondriacus*

(Peters, Jain, 1987; Brenner, 1993). Кенийские селекционеры (Gudu, Gupta, 1988) идентифицировали в популяции сорта Jumla 20 растений с мужской стерильностью. В результате многолетних исследований D.M. Brenner из Университета штата Айова (США) была зарегистрирована первая CMS-линия амаранта DB 199313 и подобран к ней закрепитель стерильности (Brenner, 2019). Вероятно, в скором времени можно ожидать появления первого гибрида амаранта на основе CMS.

Содержание белка в семенах амаранта изучалось путем диаллельных скрещиваний шести генотипов *A. hypochondriacus* (F₁ и F₂) (Pandey, Pal, 1985). Полученные гибриды превышали среднее родительское значение по изученному показателю, а гибриды от трех из этих скрещиваний превосходили лучшего родителя. Эти результаты подтверждают положительный эффект гибридизации для селекции на значимый для амаранта показатель – содержание белка в семенах.

Мутационная селекция

Для увеличения разнообразия генетических комбинаций используют как классическую гибридизацию, так и мутагенез. Частота спонтанных мутаций довольно низка, поэтому их искусственное индуцирование физическими и химическими мутагенами – более продуктивный способ селекции. Мутационная селекция амарантов для улучшения качества и количества семян базировалась главным образом на использовании радиационного мутагенеза. Так, результатом применения радиационного метода (175 Гр) стало создание мутантных линий *A. cruentus*, которые достоверно характеризовались стабильным увеличением массы 1000 семян в поколениях M4 и M5 (Gajdošová et al., 2007). В 2009 г. сообщалось о получении мутантов из местного перуанского сорта Selection Ancash с более высокими концентрациями микроэлементов и улучшенной биодоступностью за счет снижения фитиновой кислоты (Gómez-Pando et al., 2009). В исследованиях 2022 г. были получены шесть мутантных линий амаранта с устойчивостью к засолению почв (Krochemé et al., 2022). В результате исследований коллектива российских авторов после обработки азидом натрия созданы перспективные для дальнейшей селекции мутантные солеустойчивые формы амаранта, семена которых характеризовались увеличением содержания белка на 52 % и линоленовой кислоты – на 25 % (Таипова и др., 2022).

Полиплоидия

Полиплоидия считается важным эволюционным процессом у многих видов сельскохозяйственных культур. Искусственно индуцированная полиплоидия – наиболее быстрый метод создания новых генотипов. Еще 50 лет назад ряд селекционеров разных стран начали проводить исследования по повышению продуктивности зерновых и овощных амарантов путем индукции полиплоидии колхицином (Behera et al., 1974; Madhusoodanan, Pal, 1984; Sun Y., Yue, 1993). Они описали некоторые морфологические и фенологические особенности полученных растений: укорочение и утолщение стебля, увеличение размера семян на 42–159 %, сдвиг начала цветения на одну

неделю позже. Примечательно, что у тетраплоидов *A. caudatus* отмечено увеличение содержания белка (на 60 %), аминокислот лизина и треонина. Результаты показали, что полиплоидия у амаранта приводит к увеличению размера зерна без снижения продуктивности и питательной ценности, что подтверждает ценность этого метода для селекционных программ.

Генная инженерия и молекулярно-генетические методы

Прогресс в области молекулярной биологии за последние десятилетия значительно обогатил наши знания, необходимые для управления генофондом растений, способствовал значительному развитию молекулярно-генетических методов в селекции. Маркер-ассоциированная селекция (MAS) – один из таких методов, который повышает эффективность отбора по конкретному признаку, а генная инженерия позволяет произвести перенос гена из одного растительного организма в другой.

Несмотря на большой потенциал амаранта, изучению его геномики было посвящено мало исследований, направленных главным образом на идентификацию видового разнообразия (табл. 2). В результате полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) выявлена связь между конкретными фенотипами и геномными вариантами у 10 качественных признаков амаранта (Jamalluddin et al., 2022). Было идентифицировано 22 ассоциированных маркера на 16 хромосомах у 16 видов амаранта, связанных с пигментацией соцветия, листа, черешка и стебля. Данные маркеры SNP предоставляют ценную генетическую информацию для фенотипирования и улучшения сортов разных видов амаранта. Однако о работах, упоминающих создание маркеров для ценных биохимических показателей амаранта, пока не сообщалось.

Анализу полиморфизма гена, кодирующего фермент сквален-синтазы (SQS) у ряда зерновых и овощных амарантов, посвящена работа отечественных исследователей (Shcherban, Stasyuk, 2020). Показаны низкий уровень полиморфизма и консерватизм основных функциональных

доменов в кодирующей части гена. Полученные авторами результаты могут помочь при отборе зерновых амарантов с повышенной концентрацией сквалена в семенах.

В статье (Jofre-Garfias et al., 1997) были продемонстрированы результаты агробактериальной трансформации *A. hypochondriacus* на примере сорта Azteca. Авторы впервые создали метод регенерации и агробактериальную систему трансформации культуры, а также использовали ее для изучения экспрессии промотора гена светособирающего хлорофилла *a/b*-связывающего белка (*Lhcb*) у трансгенных растений. В совместной работе индийских ученых проводилось изучение потенциала опосредованной *Agrobacterium* генетической трансформации амаранта у вида *A. tricolor* с введением конструкций на основе Ti-плазмиды, несущей трансгены, повышающие устойчивость к биотическим стрессам, вызванным грибковыми патогенами, вирусами и вредителями (Pal et al., 2013). В результате был создан воспроизводимый протокол генетической трансформации, который можно использовать для получения устойчивых к биотическим факторам растений амаранта. В статье (Munusamy et al., 2013) впервые показана успешная агробактериальная трансформация цветков на соцветии *A. hypochondriacus*. Это расширило возможности при работе с культурой, так как не всегда удается добиться дифференцировки побегов из трансформированного каллуса гипокотилия (Murugan, Sathishkumar, 2016). У вида *A. cruentus* успешный метод агробактериальной трансформации из эпикотильных эксплантов был продемонстрирован в статье российских авторов (Таипова и др., 2020). Эффективность составила 4 %.

Инструменты редактирования генома могут быть задействованы и для повышения эффективности генов у других сельскохозяйственных культур. Так, гены, кодирующие белки амаранта, были использованы для создания трансгенных растений картофеля, мягкой пшеницы и кукурузы. A. Raina и A. Datta (1992) сообщали об успешном молекулярном клонировании гена, кодирующего белок семян амаранта со сбалансированным аминокислотным составом *AmA1*. Позже группой индийских ученых данный

Таблица 2. Использование генетических технологий в изучении амаранта

Генетический материал	Цель исследования	Метод	Литературный источник
33 образца зерновых амарантов	Идентификация видов	RAPD	Transue et al., 1994
41 образец 4 видов амаранта	Идентификация видов	SNP	Maughan et al., 2011
348 образцов 37 видов	Оценка генетического разнообразия	SSR	Suresh et al., 2014
<i>A. hypochondriacus</i>	QTL-картирование	SNP	Lightfoot et al., 2017
18 образцов зерновых форм	Идентификация видов, уточнение филогении	RAPD, ISSR	Лиманская и др., 2017
30 образцов <i>Amaranthus</i> spp.	Анализ 15 фенотипических характеристик	RAPD	Oduwaye et al., 2019
188 образцов овощных, зерновых и сорных видов	GWAS-анализ морфологических признаков	SNP	Nguyen et al., 2019
<i>A. cruentus</i> cv Arusha	Изучение роли специфических генов в синтезе фитиновой кислоты	Сборка генома на уровне хромосом	Ma et al., 2021
188 образцов 18 видов амаранта	GWAS-анализ морфологических признаков, таких как «форма», «размер и цвет листа, стебля и соцветия»	SNP	Jamalluddin et al., 2022

ген был успешно внедрен в картофель, что привело к увеличению общего содержания белка в клубнях на 60 %. (Chakraborty et al., 2000). Примечательно, что трансгенный картофель отличался повышением активности фотосинтеза и увеличением листовой биомассы, что отразилось и на общей урожайности (Chakraborty et al., 2010).

Этот же ген амаранта был применен для трансформации мягкой пшеницы, что увеличило содержание незаменимых аминокислот, поскольку в мягкой пшенице наблюдается острый дефицит лизина, треонина и тирозина (Tamás et al., 2009). Ученые из мексиканского Центра перспективных исследований (Centro de Investigacin y de Estudios Avanzados del IPN) для трансформации генотипа тропической кукурузы использовали ДНК 11S глобулина *A. hypochondriacus*. Были получены трансгенные растения кукурузы, сверхэкспрессирующие ген 11S глобулина, кодирующего один из запасных белков семян амаранта. В результате в семенах кукурузы на 32 % увеличилось содержание общего белка (Rascón-Cruz et al., 2004).

Достижения в области генетической трансформации открывают возможность улучшить различные характеристики зернового амаранта посредством редактирования генома в ближайшем будущем.

Потенциал коллекции амаранта ВИР для селекции

В Госреестре РФ на 2023 г. зарегистрировано 35 сортов амаранта (Государственный реестр..., 2023). Среди них самый «старинный» сорт Чергинский датируется 1995 г. и относится к наиболее представленному кормовому направлению использования (всего 17 сортов). Зерновое направление включает 3 сорта, цветочно-декоративное – 10, овощное использование – 5. Можно отметить, что отечественные селекционные достижения по культуре недостаточны как по количеству, так и по разнообразию использования.

Уникальная коллекция амаранта ВИР, не имеющая аналогов в мире, на сегодняшний день включает 570 образцов из различных стран мира (рис. 2).

Первый образец Sirukeerai (*Amaranthus* sp., пк-1) поступил из питомника “Bangalore Nursery and Gardens” (Индия)

в 1955 г. В дальнейшем коллекция пополнялась местными сортами и дикими видами за счет многочисленных экспедиций, поступлений из научно-исследовательских институтов, ботанических садов, генбанков и селекционных станций всего мира. Наибольшее количество образцов было получено из Мексики, США, Германии, а также из Индии (рис. 3).

Восемьдесят процентов коллекции представлено видами *A. cruentus* (106 образцов), *A. hypochondriacus* (89 образцов), *A. caudatus* (88 образцов), *Amaranthus* sp. (86 образцов), *A. hybridus* (51 образец) и *A. tricolor* (41 образец) (рис. 4). Большинство видов в коллекции являются однодомными. К двудомным относятся образцы видов *A. tuberculatus* и *A. palmeri*.

При комплексном изучении коллекционных образцов амаранта в ВИР проводится оценка хозяйственно ценных признаков, включая биохимические показатели, морфологическое описание и определение направлений использования. Выделенные ценные биотипы группируются в признаковые коллекции. В результате многолетних исследований на основе коллекции амаранта ВИР сформированы группы с высокой урожайностью семян, листовой биомассы, с повышенным содержанием белка в семенах, низкорослые, скороспелые и холодостойкие, устойчивые к осыпанию семян, овощного и декоративного направления использования.

В ВИР проводится исследование аминокислотного состава листовой биомассы амаранта овощного и зернового направлений использования, а также диких видов. Так, в результате изучения коллекционных образцов 12 различных видов в листовой биомассе нами идентифицировано 18 свободных аминокислот, из которых 8 – незаменимые (Sokolova et al., 2021). В качестве источника высококалорийного аминокислотного состава зеленой биомассы выделен ряд образцов амаранта зернового направления использования: *A. caudatus*, *A. cruentus* и *A. hypochondriacus*. В исследовании было установлено, что сорные виды амаранта имеют значительный потенциал с точки зрения лечебного влияния на организм человека благодаря высокому содержанию в листьях фенольных компонентов и лизина. Так, был отмечен образец *A. bli-*

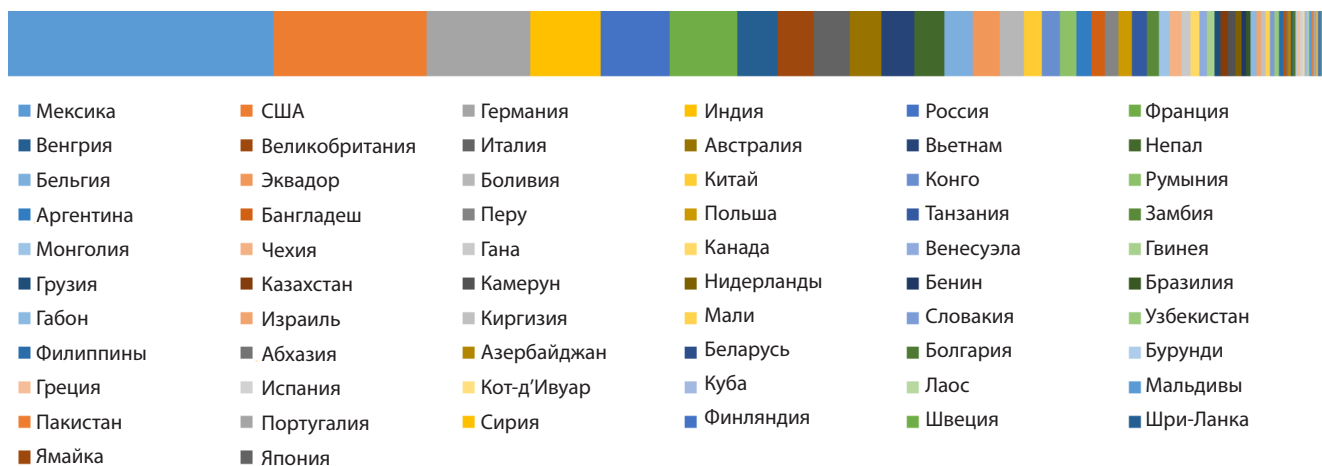


Рис. 2. Происхождение образцов амаранта коллекции ВИР.



Sirukeerai, *Amaranthus* sp.
(пк-1, Индия)



A. caudatus L.
(пк-146, Германия)



A. cruentus L.
(пк-94, США)



A. caudatus L.
(пк-150, Греция)



A. cruentus L.
(пк-218, Мексика)



A. cruentus L. 9/5
(пк-289, Мексика)



A. tricolor L.
(пк-321, Индия)



A. blitum L.
(пк-12, Индия)



Франт, *A. cruentus* L.
(пк-318, Россия)

Рис. 3. Образцы амаранта коллекции ВИР (фото сделаны на полях Пушкинских и Павловских лабораторий ВИР, Санкт-Петербург).

tum (синоним *A. lividus*) (пк-31, Индия) – лидер по содержанию аскорбиновой кислоты (90.2 мг/100 г), сахаров, органических кислот, фенольных соединений и жирных кислот, способный накапливать до 90.53 мг/100 г лизина, значительное количество тирозина, триптофана и цистина.

Одной из проблем при выращивании амаранта на территории РФ является его теплолюбивость. Оптимальная

температура прорастания семян составляет 20–25 °С (Конюков, Сергеева, 2011). Поэтому амарант может выращиваться в нашей стране в основном в южных регионах. В связи с этим существует необходимость в создании холодостойких сортов. В течение многих лет коллекция амаранта ВИР оценивается на холодостойкость в условиях Северо-Западного региона. Отбираются генотипы, харак-

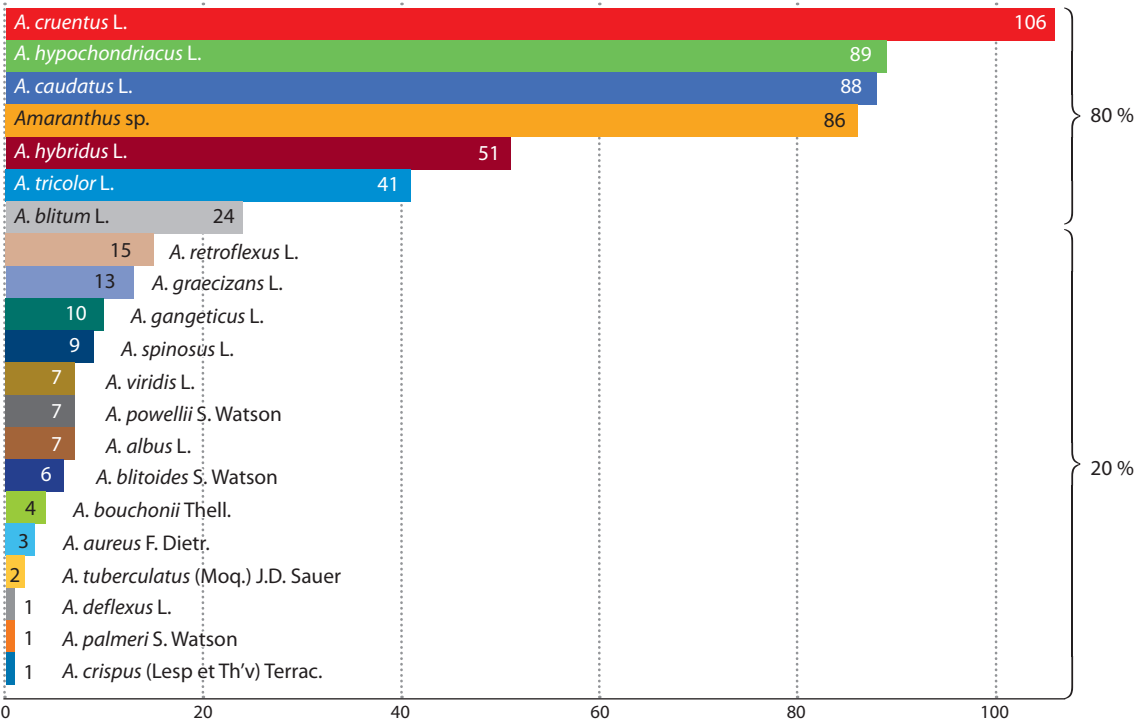


Рис. 4. Видовое разнообразие амаранта коллекции ВИР.

теризующиеся устойчивостью к пониженным температурам, способные за короткий период сформировать зрелые семена. Результатом этого направления селекционной работы служит созданный в ВИР сорт амаранта Франт, который может в условиях Ленинградской области за 90 дней формировать семена и давать три срезки зеленой массы для производства чая.

Заключение

Амарант в нашей стране стремительно набирает популярность, в последнее время ему уделяется пристальное внимание в сфере науки, медицины и производства. Это связано с разнообразным применением, уникальным биохимическим составом и терапевтическим потенциалом культуры. Широкий диапазон генетической изменчивости местных сортов некоторых видов амаранта открывает большие возможности для селекционного улучшения данной культуры как традиционными, так и современными методами.

Собранная в ВИР коллекция амаранта, имеющая почти 70-летнюю историю, уникальна по своему происхождению и разнообразию. В коллекции сформированы признаки группы по всем наиболее важным направлениям селекции. Генетическое разнообразие культуры является потенциалом для селекционного использования и активного изучения в свете современных знаний и технологий. В результате многолетнего всестороннего изучения коллекции выделены образцы, рекомендуемые для включения в селекционную работу. Следует отметить, что сохраняемый в ВИР генофонд амаранта способен предоставлять неограниченные возможности для селекции и восполнять нужды населения страны, обогащая питательный рацион продуктами из этой здоровой и полезной культуры.

Список литературы / References

Гонор К.В., Погожева А.В., Дербенева С.А., Мальцев Г.Ю., Трушина Э.Н., Мустафина О.К. Влияние антиатерогенной диеты с применением масла амаранта на антиоксидантный и иммунный статус у больных ишемической болезнью сердца и гиперлипопроотеидемией. *Вопросы питания*. 2006;75(6):30-33 [Gonor K.V., Pogozheva A.V., Derbeneva S.A., Maltsev G.Yu., Trushina E.N., Mustaphina O.K. The influence of a diet with including amaranth oil antioxidant and immune status in patients with ischemic heart disease and hyperlipoproteidemia. *Voprosy Pitaniya = Problems of Nutrition*. 2006;75(6):30-33. (in Russian)]

Государственный реестр селекционных достижений РФ, 2023. <https://gossortrf.ru/publication/reestry.php> (дата обращения: 24.04.2024)

[State Register of Selection Achievements Admitted for Usage, 2023. <https://gossortrf.ru/publication/reestry.php> (date of access: 24.04.2024). (in Russian)]

Кононков П.Ф., Сергеева В.А. Амарант – ценная овощная и кормовая культура многопланового использования. *Аграр. вестник Урала*. 2011;4:63-64 [Kononkov P.F., Sergeeva V.A. Amaranth – the valuable vegetable and forage crops multifaceted use. *Agrarnyy Vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2011;4:63-64 (in Russian)]

Кононков П.Ф., Гинс В.К., Гинс М.С. Амарант – перспективная культура XXI века. М.:РУДН, 1999 [Kononkov P.F., Gins V.K., Gins M.S. Amaranth is a Promising Crop of the 21st Century. Moscow, RUDN University Publ., 1999 (in Russian)]

Лиманская С.В., Мирошниченко Л.А., Гопций Т.И., Корнеева О.С. Полиморфизм RAPD- и ISSR-маркеров у зерновых видов амаранта. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2): 189-197. DOI 10.18699/VJ17.236 [Lymanska S.V., Miroshnichenko L.A., Goptsiy T.I., Korneeva O.S. Polymorphism of RAPD and ISSR markers in grain amaranth species. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):189-197. DOI 10.18699/VJ17.236]

- Магомедов И.М., Чиркова Т.В. Амарант – прошлое, настоящее и будущее. *Усп. соврем. естествознания*. 2015;1:1108-1113 [Magomedov I.M., Chirkova T.V. Amaranth – past, present and future. *Uspekhi Sovremennogo Yestestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2015;1:1108-1113 (in Russian)]
- Магомедов И.М., Чиркова А.И., Чиркова Т.В. Роль биопептидов и антиоксидантов зерна амаранта для профилактики хронических заболеваний человека. *Практ. фитотерапия*. 2017;2:49-54 [Magomedov I.M., Chirkova A.I., Chirkova T.V. The role of biopeptides and antioxidants from amaranth grain in the prevention of chronic human diseases. *Prakticheskaya Fitoterapiya = Practical Phytotherapy*. 2017;2:49-54 (in Russian)]
- Патент, 2022. <https://gossortrf.ru/registry/gosudarstvennyy-reestr-selektionsnykh-dostizheniy-dopushchennykh-k-ispolzovaniyu-tom-1-sorta-rasteni-frant-amarant-metelchatyy/> (дата обращения: 11.04.2024)
- [Patent, 2022. <https://gossortrf.ru/registry/gosudarstvennyy-reestr-selektionsnykh-dostizheniy-dopushchennykh-k-ispolzovaniyu-tom-1-sorta-rasteni-frant-amarant-metelchatyy/> (date of access: 04.11.2024) (in Russian)]
- Таипова Р.М., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* L. *Журн. Сиб. федер. ун-та. Сер. Биология*. 2020; 13:179-187. DOI 10.17516/1997-1389-0292 [Taipova R.M., Musin K.G., Kuluev B.R. Agrobacterium-mediated transformation of *Amaranthus cruentus* L. epicotils. *Zhurnal Sibirskogo Federal'nogo Universiteta. Seriya: Biologiya = Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2020;13:179-187. DOI 10.17516/1997-1389-0292 (in Russian)]
- Таипова Р.М., Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Кулуев Б.Р. Изменения в содержании белков, липидов и состоянии антиоксидантной системы у мутантных форм амаранта *Amaranthus cruentus* L. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2022;183: 76-85. DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-76-85 [Taipova R.M., Nesterov V.N., Rozentsvet O.A., Kuluev B.R. Changes in the content of proteins and lipids and in the state of the antioxidant system in mutant forms of *Amaranthus cruentus* L. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183:76-85. DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-76-85 (in Russian)]
- Abbasi D., Rouzbehan Y., Rezaei J. Effect of harvest date and nitrogen fertilization rate on the nutritive value of amaranth forage (*Amaranthus hypochondriacus*). *Anim. Feed Sci. Technol. Animal*. 2012;171: 6-13. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2011.09.014
- Akin-Idowu P., Gbadegesin M., Orkpeh U., Ibitoye D., Odunola O. Characterization of grain amaranth (*Amaranthus* spp.) germplasm in south west Nigeria using morphological, nutritional, and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Resources*. 2016; 5(1):6. DOI 10.3390/resources5010006
- Arreguez G.A., Martínez J.G., Ponessa G. *Amaranthus hybridus* L. ssp. *hybridus* in an archaeological site from the initial mid-holocene in the southern argentinian Puna. *Quat. Int.* 2013;307:81-85. DOI 10.1016/j.quaint.2013.02.035
- Ayorinde F.O. Determination of fatty acid composition of *Amaranthus* species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1989;66:1812-1814
- Baltensperger D.D., Weber L.E., Nelson L.A. Registration of 'Plain-smán' grain amaranths. *Crop Sci.* 1992;32:1510-1511. DOI 10.2135/cropsci1992.0011183X003200060047x
- Behera B., Tripathy A., Patnaik S.N. Histological analysis of colchicine-induced deformities and cytochimeras in *Amaranthus caudatus* and *A. dubius*. *J. Heridity*. 1974;65:179-184
- Brenner D.M. Hybrid seeds for increased amaranth grain yield. *Legacy*. 1993;6:9-11
- Brenner D.M. Registration of DB 199313, cytoplasmic male sterile grain amaranth genetic stock. *J. Plant Regist.* 2019;13:251-253. DOI 10.3198/jpr2018.06.0042crgs
- Brenner D.M., Baltensperger D.D., Kulakow P.A., Lehmann J.W., Myers R.L., Slabbert M.M., Slough B.B. Genetic resources and breeding in *Amaranthus*. In: Janick J. (Ed.) *Plant Breeding Reviews*. Wiley, New York, 2000;19:227-285. DOI 10.1002/9780470650172.ch7
- Bressani R. Composition and nutritional properties of amaranth. In: Paredes-Lopez O. (Ed.). *Amaranth, Biology, Chemistry and Technology*. Chap. 10. Boca Raton: CRC Press, 1994. DOI 10.1201/9781351069601-10
- Chagaray A. Estudio de factibilidad del cultivo del amaranto. Dirección Provincial de programación del desarrollo Ministerio de producción y desarrollo Gobierno de la provincia de Catamarca. Catamarca, Argentina, 2005
- Chakraborty S., Chakraborty N., Datta A. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97:3724-3729. DOI 10.1073/pnas.050012697
- Chakraborty S., Chakraborty N., Agrawal L., Ghosh S., Narula K., Shekhar S., Naikb P.S., Pandec P.C., Chakraborti S.K., Datta A. Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene *AmA1* is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:17533-17538. DOI 10.1073/pnas.1006265107
- Cheeke P.R., Carlsson R., Kohler G.O. Nutritive value of leaf protein concentrates prepared from *Amaranthus* species. *Can. J. Anim. Sci.* 1981;61:199-204. DOI 10.4141/cjas81-026
- Cheng A., Mayes S., Dalle G., Demissew S., Massawe F. Diversifying crops for food and nutrition security – a case of teff. *Biol. Rev.* 2015;92:188-198. DOI 10.1111/brv.12225
- Costea M., Sanders A., Waines G. Preliminary results towards revision of the *Amaranthus* hybridus species complex (Amaranthaceae). *Sida*. 2001;19:931-974
- Covas G. Perspectivas del cultivo de los amarantos en la republica Argentina. 1993. <https://www.semanticscholar.org/paper/Perspectivas-del-cultivo-de-los-amarantos-en-la-Covas/c2d32274738dbf8eb28950d2f077f6809c3b132f>
- Das S. Taxonomical observation on the grain amaranths and new varieties of *Amaranthus cruentus* (Amaranthaceae). *Nord. J. Bot.* 2012; 30:412-420. DOI 10.1111/j.1756-1051.2011.01383.x
- Das S. *Amaranthus*: A Promising Crop of FUTURE. Springer, Singapore, 2016. DOI 10.1007/978-981-10-1469-7
- Dawson I.K., Park S.E., Attwood S.J., Jamnadass R., Powell W., Sunderland T., Carsan S. Contributions of biodiversity to the sustainable intensification of food production. *Global Food Secur.* 2019;21:23-37. DOI 10.1016/j.gfs.2019.07.002
- De Montellano B.R.O. Aztec medicine, health, and nutrition. Rutgers University Press, Great Britain, 1990
- Ebert A. Potential of underutilized traditional vegetables and legume crops to contribute to food and nutritional security, income and more sustainable production systems. *Sustainability*. 2014;6:319-335. DOI 10.3390/su6010319
- Espitia E. Amaranth germplasm development and agronomic studies in Mexico. *Food Rev. Int.* 1992;8:71-86. DOI 10.1080/87559129209540930
- Evon P., de Langalerie G., Labonne L., Merah O., Talou T., Ballas S., Véronèse T. Low-density insulation blocks and hardboards from amaranth (*Amaranthus cruentus*) Stems, a new perspective for building applications. *Coatings*. 2021;11:349. DOI 10.3390/coatings11030349
- Gajdošová A., Libiaková G., Fejér J. Improvement of selected *Amaranthus* cultivars by means of mutation induction and biotechnological approaches. 2007. In: Ochatt S., Mohan Jain S. (Eds.). *Breeding of Neglected and Under-utilized Crops, Spices and Herbs*. Edenbridge Ltd. USA, 2007;151-169
- Gamel T.H., Mesallam A.S., Damir A.A., Shekib L.A., Linssen J.P. Characterization of amaranth seed oils. *J. Food Lipids*. 2007;14: 323-334
- Gómez-Pando L.R., Eguiluz A., Jiménez J., Falconi J., Aguilar E., Shu Q. Barley (*Hordeum vulgare*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*) improvement by mutation induction in Peru. In: Shu Q.Y. (Ed.).

- Induced Plant Mutation in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009;330-332
- Greizerstein E.J., Poggio L. Estudios citogenetico de seis hibridos inter-especificos de *Amaranthus. Darwiniana*. 1992;31:159-165
- Greizerstein E.J., Poggio L. Meiotic studies of spontaneous hybrids of *Amaranthus*: genome analysis. *Plant Breed.* 1995;114:448-450
- Grobelnik-Mlakar S., Turinek M., Jakop M., Bavec M., Bavec F. Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura*. 2009;6:43-53
- Gudu S., Gupta V.K. Male-sterility in the grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* ex-Nepal) variety Jumla. *Euphytica*. 1988;37:23-26. DOI 10.1007/BF00037218
- Hauptli H., Jain S.K. Biosystematics and agronomic potential of some weedy and cultivated amaranths. *Theor. Appl. Genet.* 1978;52:177-185. DOI 10.1007/bf00282575
- Hauptli H., Jain S. Genetic variation in outcrossing rate and correlated floral traits in a population of grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Genetica*. 1985;66:21-27. DOI 10.1007/bf00123602
- He H.P., Corke H. Oil and squalene in *Amaranthus* grain and leaf. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:7913-7920. DOI 10.1021/jf030489q
- Huang Z.R., Lin Y.K., Fang J.Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*. 2009;14:540-554. DOI 10.3390/molecules14010540
- Jamalluddin N., Massawe F.J., Mayes S., Ho W.K., Symonds R.C. Genetic diversity analysis and marker-trait associations in *Amaranthus* species. *PLoS One*. 2022;17:0267752. DOI 10.1371/journal.pone.0267752
- Jofre-Garfias A.E., Villegas-Sepúlveda N., Cabrera-Ponce J.L., Adame-Alvarez R.M., Herrera-Estrella L., Simpson J. Agrobacterium-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter. *Plant Cell Rep.* 1997;16:847-852. DOI 10.1007/s002990050332
- Joshi B.D., Rana R.S. Grain Amaranths: the Future Food Crops. New Delhi: National Bureau of Plant Genetic Resources, 1991
- Joshi B.D., Mehra K.L., Sharma S.D. Cultivation of grain amaranth in the north-western hills. *Indian Farming*. 1983;32:34-37
- Joshi D.C., Sood S., Hosahatti R., Kant L., Pattanayak A., Kumar A., Yadav D., Stetter M.G. From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:1807-1823. DOI 10.1007/s00122-018-3138-y
- Kauffman C.S. Thoughts on the development of improved varieties of grain amaranth. In: Proceedings Third Amaranth Conference, Grain Amaranth: Expanding Consumption through Improved Cropping, Marketing and Crop Development. Rodale Press, USA, 1984
- Kauffman C.S. Realizing the potential of grain amaranth. *Food Rev. Int.* 1992;8:5-21. DOI 10.1080/87559129209540927
- Kauffman C.S., Weber L.E. Grain amaranth. In: Advances in New Crops. Portland: Timber Press, 1990;127-139
- Khoshoo T.N., Pal M. Cytogenetic pattern in *Amaranthus*. *Chromosomes Today*. 1972;3:259-267
- Khoury C.K., Bjorkman A.D., Dempewolf H., Ramirez-Villegas J., Guarino L., Jarvis A., Rieseberg L.H., Struik P.C. Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:4001-4006. DOI 10.1073/pnas.1313490111
- Kpochemé A.O.E.K., Hotegni N.F., Missihoun A.A., Gnanvi B.N., Atou R., Wouyou A., Montcho D., Gandonou C.B., Agbangla C., Ahoton L. Morphological characterization of *Amaranthus cruentus* L. mutant lines derived from local and preferred *Amaranthus* cultivar. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2022;16:1554-1569. DOI 10.4314/ijbcs.v16i4.16
- Lehmann J.W., Clark R.L., Frey K.J. Biomass heterosis and combining ability in interspecific and intraspecific matings of grain amaranths. *Crop Sci.* 1991;31:1111-1116. DOI 10.2135/cropsci1991.0011183x003100050004x
- Leon-Camacho M., Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio R. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. *Eur. Food Res. Technol.* 2001;213:349-355. DOI 10.1007/s002170100340
- Lightfoot D.J., Jarvis D.E., Ramaraj T., Lee R., Jellen E.N., Maughan P.J. Single-molecule sequencing and Hi-C-based proximity-guided assembly of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) chromosomes provide insights into genome evolution. *BMC Biology*. 2017;15:74. DOI 10.1186/s12915-017-0412-4
- Ma X., Vaistij F.E., Li Y., Van Rensburg W.S.J., Harvey S., Bairu M.W., Venter S.L., Mavengahama S., Ning Z., Graham I.A., Deynze A.V., Peer Y.V., Denby K.J. A chromosome-level *Amaranthus cruentus* genome assembly highlights gene family evolution and biosynthetic gene clusters that may underpin the nutritional value of this traditional crop. *Plant J.* 2021;107:613-628. DOI 10.1111/tpj.15298
- Madhusoodanan K.J., Pal M. Autotetraploids in *Amaranthus tricolor* Linn. *Indian J. Genet.* 1984;44:181-185
- Mangelsdorf P.C. Genetic potentials for increasing yields of food crops and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1966;56:370-375. DOI 10.1073/pnas.56.2.370
- Maughan P., Smith S., Fairbanks D., Jellen E. Development, characterization, and linkage mapping of single nucleotide polymorphisms in the grain amaranths (*Amaranthus* sp.). *Plant Gen.* 2011;4:92. DOI 10.3835/plantgenome2010.12.0027
- Mayes S., Massawe F.J., Alderson P.G., Roberts J.A., Azam-Ali S.N., Hermann M. The potential for underutilized crops to improve security of food production. *J. Exp. Bot.* 2011;63:1075-1079. DOI 10.1093/jxb/err396
- Miettinen T.A., Vanhanen H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994;59(2):356-363. DOI 10.1093/ajcn/59.2.356
- Mohindeen H.K., Irulappan I. Improvement in amaranths. In: Chadha K.L., Kalloo G. (Eds.) Advances in Horticulture: Vegetable Crops. New Delhi: Malhotra Publishing House, 1993
- Munusamy U., Abdullah S.N.A., Aziz M.A., Khazaai H. Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013;4:188-192. DOI 10.4236/abb.2013.42027
- Murray M.J. The genetics of sex determination in the family Amaranthaceae. *Genetics*. 1940;25:409-431. DOI 10.1093/genetics/25.4.409
- Murugan S.B., Sathishkumar R. Establishment of high frequency callus induction and genetic transformation in neglected leafy vegetable *Amaranthus trisris*. *Austin J. Biotechnol. Bioeng.* 2016;3:1058
- Myers R.L., Putnam D.H. Growing grain amaranth as a specialty crop. Center for alternative crops and products, university of Minnesota. 1988. <https://conservancy.umn.edu/items/d6b7c0a1-6c3e-45a8-bf8d-08ab79a5cdeb> (date of access: 28.06.2024)
- Nguyen D.C., Tran D.S., Tran T.T.H., Ohsawa R., Yoshioka Y. Genetic diversity of leafy amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) resources in Vietnam. *Breed. Sci.* 2019;69:640-650. DOI 10.1270/jsbbs.19050
- Oduwaye O.A., Ayo-Vaughan M.A., Porbeni J.B.O., Oyelakin O.O. Genetic diversity in Amaranth (*Amaranthus* spp.) based on phenotypic and RAPD markers. *Nigerian J. Biotechnol.* 2019;36:62-68. DOI 10.4314/njb.v36i1.9
- Pal A., Swain S.S., Das A.B., Mukherjee A.K., Chand P.K. Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 2013;49:114-128. DOI 10.1007/s11627-013-9489-9
- Palombini S.V., Claus T., Maruyama S.A., Gohara A.K., Souza A.H.P., Souza N.E., Visentainer J.V., Gomes S.T.M., Matsushita M. Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Sci. Technol.* 2013;33:339-344. DOI 10.1590/s0101-20612013005000051
- Pandey R.M., Pal M. Genetics of grain protein in *Amaranthus*. *Crop Improv.* 1985;12:55-58

- Peters I., Jain S. Genetics of grain amaranths. Gene-cytoplasmic male-sterility. *J. Heredity*. 1987;78:251-256. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110377
- Raiger H.L., Bhandari D.C. Underutilized crops: varieties released in India. All India Coordinated Research Network on Underutilized Crops. New Daihi: NBPGR, 2012
- Raina A., Datta A. Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89:11774-11778. DOI 10.1073/pnas.89.24.11774
- Ramdwar M.N., Chadee S.T., Stoute V.A. Estimating the potential consumption level of amaranth for food security initiatives in Trinidad, West Indies. *Cogent Food Agric*. 2017;3:1321475. DOI 10.1080/23311932.2017.1321475
- Rao C.V., Newmark H.L., Reddy B.S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 1998;19:287-290. DOI 10.1093/carcin/19.2.287
- Rascón-Cruz Q., Sinagawa-García S., Osuna-Castro J.A., Bohorova N., Paredes-López O. Accumulation, assembly, and digestibility of amaranthin expressed in transgenic tropical maize. *Theor. Appl. Genet*. 2004;108:335-342. DOI 10.1007/s00122-003-1430-x
- Rezaei J., Rouzbehan Y., Fazaeli H. An assessment of digestibility and protein quality of the fresh and ensiled amaranth forage according to CNCPS. *Iranian J. Anim. Sci*. 2009;40:31-38
- Ruth O.N., Unathi K., Nomali N., Chinsamy M. Underutilization versus nutritional-nutraceutical potential of the *Amaranthus* food plant: a mini-review. *Appl. Sci*. 2021;11:6879. DOI 10.3390/app11156879
- Sauer J.D. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Mo. Bot. Gard*. 1967;54:103-137. DOI 10.2307/2394998
- Saunders R.M., Becker R. *Amaranthus*: a potential food and feed resource. In: Pomeranz Y. (Ed.). *Advances in Cereal Science and Technology*. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1984; 357-396
- Schulz-Schaeffer J., Stallknecht G.F., Baldrige D.E., Larson R.A. Registration of Montana-3 grain amaranth germplasm. *Crop Sci*. 1989a;29:244-245
- Schulz-Schaeffer J., Webb D.M., Baldrige D.E., Stallknecht G.F., Larson R.A. Registration of Montana-5 grain amaranth germplasm. *Crop Sci*. 1989b;29:1581
- Schulz-Schaeffer J., Baldrige D.E., Bowman H.F., Stallknecht G.F., Larson R.A. Registration of 'Amont' grain amaranth. *Crop Sci*. 1991;31:482-483
- Shadi H., Rouzbehan Y., Rezaei J., Fazaeli H. Yield, chemical composition, fermentation characteristics, in vitro ruminal variables, and degradability of ensiled amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivars compared with corn (*Zea mays*) silage. *Transl. Anim. Sci*. 2020;4:1-12. DOI 10.1093/tas/txaa180
- Shcherban A.B., Stasyuk A.I. Polymorphism of the squalene synthase gene (*SQS*) in different species of amaranth (*Amaranthus* L.). *Russ. J. Genet*. 2020;56:298-306. DOI 10.31857/S0016675820030145
- Singh A., Mahato A.K., Maurya A., Rajkumar S., Singh A.K., Bhardwaj R., Kaushik S.K., Kumar S., Gupta V., Singh K., Singh R. Amaranth Genomic Resource Database: an integrated database resource of Amaranth genes and genomics. *Front. Plant Sci*. 2023;14:1203855. DOI 10.3389/fpls.2023.1203855
- Sleugh B.B., Moore K.J., Brummer E.C., Knapp A.D., Russell J., Gibson L. Forage value of various amaranth species at different harvest dates. *Crop Sci*. 2021;41:466-472. DOI 10.2135/cropsci2001.412466x
- Smith M.E. The Aztecs. Blackwell, Oxford, 1996
- Smith T.J. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opin. Invest. Drugs*. 2000;9:1841-1848. DOI 10.1517/13543784.9.8.1841
- Sokolova D., Zvereva O., Shelenga T., Solovieva A. Comparative characteristics of the amino acid composition in amaranth accessions from the VIR collection. *Turk. J. Agric. For*. 2021;45:68-78. DOI 10.3906/tar-2007-7
- Soriano-Garcia M., Arias-Olguín I.I., Montes J.P.C., Ramirez D.G.R., Silvestre Mendoza Figueroa J., Flores-Valverde E., Rodriguez M.R.V. Nutritional functional value and therapeutic utilization of amaranth. *J. Analytical Pharm. Res*. 2018;7(5):596-600. DOI 10.15406/japlr.2018.07.00288
- Sreelathakumary I., Peter K.V. Amaranth-*Amaranthus* spp. In: Kallo G., Bergh B.O. (Eds.). *Genetic Improvement of Vegetable Crops*. Oxford: Pergamon Press, 1993; 315-323
- Stallknecht G.F., Schulz-Schaeffer J.R. Amaranth rediscovered. In: Janick J., Simon J.E. (Eds.). *New Crops*. New York: Wiley, 1993
- Stetter M.G., Zeitler L., Steinhaus A., Kroener K., Biljecki M., Schmid K.J. Crossing methods and cultivation conditions for rapid production of segregating populations in three grain amaranth species. *Front. Plant Sci*. 2016;7:816. DOI 10.3389/fpls.2016.00816
- Sun Y., Yue S. Research on polyploid grain amaranth – a preliminary study on selection of grain amaranth with character of bigger seed (in Chinese). In: Yue S. (Ed.). *The Research and Development of Grain Amaranth in China*. Beijing, China, 1993
- Sun G.Q., Ma J., Du W., Wang Y., Li S.L., Xiong Y., Yu X., Lei X., Yabin M.L. Effects of dietary supplementation of *Amaranthus hypochondriacus* L. on Ruminant fermentation, blood indicators and performance of dairy cows. *Chin. J. Animal Nutr*. 2017;29:1652-1660
- Suresh S., Chung J.-W., Cho G.-T., Sung J.-S., Park J.-H., Gwag J.-G., Baek H.-J. Analysis of molecular genetic diversity and population structure in *Amaranthus* germplasm using SSR markers. *Plant Biosyst. – Int. J. Dealing Aspects Plant Biosyst*. 2014;148:635-644. DOI 10.1080/11263504.2013.788095
- Tamás C., Kisgyörgy B.N., Rakszegi M., Wilkinson M.D., Yang M.-S., Láng L., Tamas L., Bedő Z. Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality. *Plant Cell Rep*. 2009;28:1085-1094. DOI 10.1007/s00299-009-0716-0
- Tang Y., Tsao R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: A review. *Mol. Nutr. Food Res*. 2017;61:1600767. DOI 10.1002/mnfr.201600767
- Teutonico R.A., Knorr D. Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered food crop. *Food Technol*. 1985;1:49-60
- Transue D.K., Fairbanks D.J., Robison L.R., Andersen W.R. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. *Crop Sci*. 1994;34:1385. DOI 10.2135/cropsci1994.0011183x003400050044x
- Venskutonis P.R., Kraujalis P. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2013;12:381-412. DOI 10.1111/1541-4337.12021

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.05.2024. После доработки 30.07.2024. Принята к публикации 31.07.2024.


DOI 10.18699/vjgb-24-82

Изменения в черной субстанции головного мозга у мышей, моделирующих болезнь Паркинсона

И.Н. Рожкова¹, С.В. Окотруб¹, Е.Ю. Брусенцев ¹, Т.А. Рахманова^{1, 2}, Д.А. Лебедева¹, В.С. Козенева^{1, 2},
Н.А. Шавшаева^{1, 2}, Н.В. Хоцкин¹, С.Я. Амстиславский¹ 

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 amstis@yandex.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона (БП) – возрастная нейродегенеративная патология центральной нервной системы. Наиболее характерными нарушениями при БП считаются аномалии в нигростриарной системе, включающей в себя черную субстанцию среднего мозга и полосатое тело. При БП аномалии дофаминергической системы мозга сопровождаются альфа-синуклеинопатией. Для изучения механизмов возникновения данной патологии созданы генетические модели на мышах. Трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*^{A53T})23Mkle/J (далее по тексту B6.Cg-Tg) имеют мутацию A53T в гене SNCA альфа-синуклеина человека. В нашей предыдущей работе оценена плотность нейронов в префронтальной коре, гиппокампе, черной субстанции и полосатом теле у мышей этой линии, однако дофаминергическая система мозга, которая играет ключевую роль в развитии БП, изучена не была. Целью настоящего исследования стало изучение координации движений и баланса тела, а также плотности дофаминовых нейронов и накопления альфа-синуклеина в черной субстанции самцов мышей линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев. В качестве контроля использованы сибсы, у которых не было экспрессии гена SNCA с мутацией A53T и экспрессировался мышинный альфа-синуклеин (далее по тексту – диккий тип; wild type, WT), того же пола и возраста, из тех же самых выводов, что и исследуемые мыши B6.Cg-Tg. Координация движений и баланс тела были изучены с помощью теста «рота-род»; плотность дофаминовых нейронов и накопление альфа-синуклеина в черной субстанции оценены иммуногистохимическим методом. Полученные результаты показывают, что мыши B6.Cg-Tg не имеют отличий по координации движений и баланса тела от контроля – сибсов дикого типа. Однако у мышей B6.Cg-Tg в черной субстанции были обнаружены накопление альфа-синуклеина и уменьшение числа дофаминовых нейронов. Таким образом, мыши линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев имеют симптомы начала развития БП, такие как накопление мутантного альфа-синуклеина и уменьшение числа дофаминовых нейронов в черной субстанции. Полученные в этом исследовании результаты позволяют характеризовать линию B6.Cg-Tg в качестве адекватной модели для изучения ранней стадии БП человека уже в возрасте шести месяцев.

Ключевые слова: мыши; болезнь Паркинсона; координация движений; дофаминергическая система мозга; альфа-синуклеин.

Для цитирования: Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А., Лебедева Д.А., Козенева В.С., Шавшаева Н.А., Хоцкин Н.В., Амстиславский С.Я. Изменения в черной субстанции головного мозга у мышей, моделирующих болезнь Паркинсона. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):744-751. DOI 10.18699/vjgb-24-82

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ, № 23-25-00123.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН.


Вклад авторов. Идея работы и планирование эксперимента – С.Я.А., И.Н.Р., Е.Ю.Б.; проведение поведенческих экспериментов – И.Н.Р., В.С.К., Ш.Н.А., Н.В.Х.; обработка результатов – С.В.О., Е.Ю.Б., Д.А.Л., Т.А.Р., В.С.К., С.Я.А.; написание и редактирование рукописи – С.Я.А., Е.Ю.Б., В.С.К., Ш.Н.А.

Substantia nigra alterations in mice modeling Parkinson's disease

I.N. Rozhkova¹, S.V. Okotrub¹, E.Yu. Brusentsev ¹, T.A. Rakhmanova^{1, 2}, D.A. Lebedeva¹, V.S. Kozeneva^{1, 2},
N.A. Shavshaeva^{1, 2}, N.V. Khotskin¹, S.Ya. Amstislavsky¹ 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 amstis@yandex.ru

Abstract. Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative pathology of the central nervous system. The well-known abnormalities characteristic of PD are dysfunctions in the nigrostriatal system including the substantia nigra of the midbrain and the striatum. Moreover, in PD persons, alpha-synucleinopathy is associated with abnormalities in the dopaminergic brain system. To study the mechanisms of this pathology, genetic models in mice have been designed. Transgenic mice of the B6.Cg-Tg(Pnnp-SNCA*A53T)23Mkle/J strain (referred to as B6.Cg-Tg further in the text) possess the A53T mutation in the human alpha-synuclein *SNCA* gene. The density of neurons in the prefrontal cortex, hippocampus, substantia nigra and striatum in B6.Cg-Tg mice was assessed in our previous work, but the dopaminergic system was not studied there, although it plays a key role in the development of PD. The aim of the current study was to investigate motor coordination and body balance, as well as dopaminergic neuronal density and alpha-synuclein accumulation in the substantia nigra in male B6.Cg-Tg mice at the age of six months. Wild-type mice of the same sex and age, siblings of the B6.Cg-Tg mice from the same litters, lacking the *SNCA* gene with the A53T mutation, but expressing murine alpha-synuclein, were used as controls (referred to as the wild type further in the text). Motor coordination and body balance were assessed with the rota-rod test; the density of dopaminergic neurons and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra were evaluated by the immunohistochemical method. There was no difference between B6.Cg-Tg mice and WT siblings in motor coordination and body balance. However, accumulation of alpha-synuclein and a decrease in the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra were found in the B6.Cg-Tg mouse strain. Thus, the mice of the B6.Cg-Tg strain at the age of six months have some symptoms of the onset of PD, such as the accumulation of mutant alpha-synuclein and a decrease in the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Taken together, the results obtained in our work qualify the B6.Cg-Tg strain as a pertinent model for studying the early stage of human PD already at the age of six months.

Key words: mice; Parkinson's disease; motor coordination; dopaminergic brain system; alpha-synuclein.

For citation: Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Rakhmanova T.A., Lebedeva D.A., Kozeneva V.S., Shavshaeva N.A., Khotksin N.V., Amstislavsky S.Ya. Substantia nigra alterations in mice modeling Parkinson's disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):744-751. DOI 10.18699/vjgb-24-82

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием человека; наиболее часто встречается идиопатическая и спорадическая БП (Beitz, 2014; Tran et al., 2020; Bidesi et al., 2021). Основные симптомы БП – нарушение моторных функций: ригидность мышц, тремор в состоянии покоя и брадикинезия (Halliday et al., 2006; Beitz, 2014). Для данного заболевания характерны также не связанные напрямую с изменением моторики аномалии, в частности нарушение сна, нервно-психические и когнитивные расстройства (Beitz, 2014; Hayes, 2019). При разных формах БП у пациентов могут быть прогрессирующие с возрастом нарушения в различных структурах головного мозга (Halliday et al., 2006; Dickson et al., 2009).

Эта патология имеет множественные отклонения, связанные с синтезом нейромедиаторов в головном мозге и функцией их рецепторов (Jellinger, 1991; Deutch et al., 2006). Наиболее характерными нарушениями при БП считаются аномалии в нигростриарной системе, которая включает в себя черную субстанцию (ЧС) среднего мозга и полосатое тело (ПТ) (Dickson et al., 2009; Beitz, 2014; Hayes, 2019). Нигростриарная система играет ключевую роль в контроле движения за счет активации дофаминовых нейронов и передачи сигнала во время включения мышц-сгибателей и разгибателей (Korchounov et al., 2010).

Другая особенность БП – накопление альфа-синуклеина в нейронах головного мозга, в частности в ПТ и ЧС (Dickson et al., 2009; Burre et al., 2018; Lai et al., 2021). Альфа-синуклеин – это белок, принимающий участие в поддержании функциональной активности синапсов, а именно в регуляции биосинтеза, транспорта и хранения дофамина (Burre et al., 2018; Bidesi et al., 2021). При БП идентифицируют две мутации в гене альфа-синуклеина, A53T и A30P, которые приводят к нарушению фолдинга белка и агрегации его мономеров (Polymeropoulos et al.,

1997; Spillantini et al., 1997). Таким образом, характерными маркерами БП являются уменьшение плотности нейронов и накопление альфа-синуклеина в различных структурах нигростриарного пути (Dickson et al., 2009; Venda et al., 2010; Poewe et al., 2017).

Для изучения механизмов возникновения БП и поиска путей коррекции этого заболевания используют модели, созданные на животных. В основном их можно разделить на две группы: токсические и генетические (Григорян, Базян, 2007; Korolenko et al., 2020). Исследования показали, что как поражения нейронов в ЧС, так и точечные нарушения в ПТ приводят к одновременной дисфункции мышц-сгибателей и разгибателей (Stern, 1966; Kato, Kimura, 1992). Чаще всего при БП аномалии плотности нейронов и двигательной активности сопровождаются альфа-синуклеинопатией (Dickson, 2018).

В настоящее время наиболее востребованные для исследований модели БП – трансгенные линии мышей, у которых экспрессируются мутантные формы гена *SNCA* альфа-синуклеина человека: A30P и/или A53T (Unger et al., 2006; Григорян, Базян, 2007; Korolenko et al., 2020). Дегенерация нигростриарной системы у мышей коррелирует с наблюдаемым двигательным дефицитом этих животных (Chia et al., 2020). Трансгенные мыши с мутацией A30P в гене *SNCA* демонстрируют, как правило, более мягкий фенотип заболевания, чем мыши с мутацией A53T в гене *SNCA*, что может затруднять изучение поведенческих особенностей и нарушений в различных структурах головного мозга (Van der Putten et al., 2000; Lee et al., 2001; Crabtree, Zhang, 2012). На полученные результаты при сравнении разных моделей БП может влиять и то, на основе какой линии создана модель, как и перед каким промотором встроены трансген и другие факторы (Crabtree, Zhang, 2012).

Для изучения БП на моделях, полученных на мышах, используют ряд подходов (Graham, Sidhu, 2010; Tikhonova

et al., 2020; Langley et al., 2021). В частности, широко применяют тест «рота-род» (PP), с помощью которого исследуют координацию движений и баланса тела (Graham, Sidhu, 2010; Seo et al., 2020). Однако результаты тестирования ключевых признаков, характеризующих БП, могут отличаться, если один и тот же трансген проявляется на различном генетическом фоне. В обзорной статье D.M. Crabtree и J. Zhang (2012) подробно описано влияние того, как на проявление признаков патологии влияют разные генетические факторы, в частности, на основе какой линии создана модель болезни Паркинсона, как и перед каким промотором встроены трансген. В работе (Paumier et al., 2013) трансгенные мыши с альфа-синуклеином человека и мутацией A53T демонстрируют более длительный латентный период до падения со вращающегося барабана в тесте PP, характеризующем координацию движений и баланс тела, по сравнению с сибсами дикого типа уже в возрасте двух месяцев. В других работах, выполненных на трансгенных линиях мышей с тем же альфа-синуклеином человека с мутацией A53T, результат был либо противоположным (Graham, Sidhu, 2010), либо различия в тесте PP с контрольными животными дикого типа отсутствовали даже в возрасте девяти месяцев (Liu et al., 2018), в зависимости от генетической основы, на которой была получена трансгенная линия мышей.

При изучении мышей, моделирующих БП, также применяют иммуногистохимические методы для исследования различных структур головного мозга (Tang et al., 2017; Korolenko et al., 2020; Langley et al., 2021). В фокусе этих исследований находятся ЧС и ПТ, в которых происходят основные изменения при БП (Burre et al., 2018; Lai et al., 2021).

Трансгенные гемизиготные мыши линии B6.Cg-Tg (PrNp-SNCA*A53T)23Mkl/J (далее по тексту – B6.Cg-Tg) с мутацией A53T в гене *SNCA* альфа-синуклеина человека созданы в Джексонской лаборатории (США) (<https://www.jax.org/strain/006823>). Этот ген экспрессируется не у всех потомков (Unger et al., 2006), соответственно, среди сибсов могут быть потомки как с патологией, так и без нее (дикий тип). Модель отражает особенности поведения и воспроизводит симптомы синуклеинопатии, в частности возрастную нейродегенерацию, характерную для БП (Pupyshv et al., 2018; Korolenko et al., 2020; Seo et al., 2020; Zhang et al., 2022).

В работах по исследованию мышей B6.Cg-Tg как модели БП в качестве контрольной группы практически всегда используют мышей линии C57BL/6J, выбранных случайным образом (Pupyshv et al., 2018; Seo et al., 2020). Материнская среда оказывает на потомков достаточно сильное воздействие, в том числе через эпигенетические механизмы как во время беременности, так и в ранний постнатальный период (Case et al., 2010; Nicholas, Ozanne, 2019; Wu, Dean, 2020). Выбор адекватного контроля является важнейшей составляющей экспериментального дизайна, так как позволяет нивелировать факторы, которые могут повлиять на оцениваемые параметры. В частности, к таким факторам может относиться влияние матери как в течение пренатального развития (Wu, Dean, 2020), так и в ходе раннего постнатального онтогенеза во время периода вскармливания (Case et al., 2010). Для минимизации

материнского эффекта рекомендовано сравнивать сибсы, особенно при исследовании трансгенных и нокаутных животных (Holmdahl, Malissen, 2012; Chen et al., 2020). Таким образом, исследование, проведенное на мышях линии B6.Cg-Tg в сравнении с сибсами дикого типа в качестве контроля, будет более корректным.

На мышях B6.Cg-Tg с мутацией A53T в гене *SNCA*, моделирующих БП человека, до сих пор недостаточно исследован нигростриарный путь головного мозга, важный для развития данной патологии. В нашей предыдущей работе (Рожкова и др., 2023) исследована плотность нейронов в префронтальной коре, гиппокампе, ЧС и ПТ у мышей линии B6.Cg-Tg на раннем этапе развития этой патологии, а именно: в возрасте шести месяцев, однако дофаминергическая система, которая играет ключевую роль в развитии этого заболевания, не была изучена.

Цель настоящей работы – сравнение самцов мышей линии B6.Cg-Tg с сибсами дикого типа (wild type, WT) по следующим параметрам: 1) координация движений и баланса тела; 2) накопление альфа-синуклеина; 3) плотность дофаминовых нейронов в черной субстанции.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В эксперименте исследованы самцы – сибсы двух линий мышей, полученные после спаривания самок C57BL/6J (4 самки) с гемизиготными самцами мышей B6.Cg-Tg (4 самца). В результате было рождено 4 помета. У потомков мышей проводили генотипирование. В опытную группу выбирали тех животных, у которых была обнаружена мутация A53T (B6.Cg-Tg), остальных использовали в качестве контроля (дикий тип). Всего было получено 5 гемизиготных самцов мышей B6.Cg-Tg, моделирующих БП, и 10 самцов дикого типа, у которых, по результатам генотипирования, экспрессии гена *SNCA* с мутацией A53T не обнаружено.

Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером 34.3 × 29.2 × 15.5 см, при температуре 22–24 °C и влажности 40–50 %, с инвертированным 12:12-часовым циклом дня-ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстилки использовали березовую щепу фракционную для лабораторных животных. Животные имели свободный доступ к стандартизированному комбикорму для лабораторных мышей и крыс ЛбК 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 («БиоПро», Россия) и очищенной воде «Северянка» («Экопроект», Россия), обогащенной минеральными добавками.

Все исследования одобрены комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 145 от 29.03.2023) и соответствуют требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Исследование координации движений и баланса тела. В возрасте шести месяцев изучали мышей линии B6.Cg-Tg, у которых была подтверждена мутация A53T (5 самцов), и контрольных животных дикого типа (10 самцов) из тех же пометов, у которых, по результатам генотипирования, экспрессии гена *SNCA* с мутацией A53T

обнаружено не было. Оценивали координацию движений и баланс тела с помощью теста РР. За два дня до начала тестирования животные были изолированы друг от друга и помещены в чистую индивидуальную клетку OptiMice размером $34.3 \times 29.2 \times 15.5$ см. Перед тестированием каждого животного оборудование обрабатывали 6 % раствором перекиси водорода.

Тест РР с ускорением используют для оценки координации движений и баланса тела при изучении нейродегенеративных заболеваний; в частности его применяют при изучении генетических моделей БП, созданных на мышах (Seo et al., 2020). Устройство Ugo Basile 47 600 (Ugo Basile, Италия) представляет собой пять дорожек шириной 5.7 см с барабанами диаметром 3 см, расположенных на высоте 16 см и разделенных плоскими круглыми деталями. Прибор имеет размеры $27.94 \times 43.18 \times 38.10$ см, вес 6.4 кг и ускорение 2–80 об/мин. Тест РР был запрограммирован на вращение с линейно возрастающей скоростью от 5 до 40 об/мин за 300 с. Для повышения надежности результатов тестирования выполняли три сессии для каждого тестируемого животного с перерывами в одну минуту. Оценивали время до падения мыши с барабана для каждой сессии. Непосредственно после проведения теста РР изучали мозг мышей линии B6.Cg-Tg, у которых было подтверждено наличие гена *SNCA* с мутацией A53T (5 самцов), и контрольных животных дикого типа (5 самцов) из тех же пометов. Животных для исследования выбрали случайным образом из четырех пометов. Исследования головного мозга проводили после интракардиальной перфузии.

Интракардиальную перфузию для фиксации ткани головного мозга производили, как описано ранее (Рожкова и др., 2023). Мышей наркотизировали путем введения внутривенно медетомидина гидрохлорида (Медитин, 0.01 мг/кг; «АПИ-САН», Россия) и через 10 мин – золетил (Zoletil, 50 мг/кг; Virbac, Франция). После этого животным проводили перфузию, вводя в кровеносную систему сначала 15 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 15 мл 10 % раствора формалина. Мозг извлекали и помещали в 30 % раствор сахарозы в PBS с добавлением 5 мл 10 % формалина для обезвоживания и последующей фиксации и хранили при +4 °C в течение следующих двух недель, пока материал не опустится на дно пробирки. Затем образцы мозга погружали в Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), после чего замораживали и хранили при –70 °C в горизонтальном низкотемпературном морозильнике MDF-594 (Sanyo, Япония).

Приготовление замороженных срезов мозга. Согласно атласу G. Paxinos и K. Franklin (2012) были изготовлены замороженные срезы ЧС (substantia nigra, SNC), которая была идентифицирована на расстоянии –3.08...–3.52 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм готовили на криотоме HM550 OP (Thermo Fisher Scientific, США) при –25 °C и помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием PCT со шлифованной кромкой и колорированным краем (CITOTEST, Китай).

Иммуногистохимический анализ. Окрашивание образцов выполняли в соответствии с протоколами производителей наборов антител. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией

в течение 5 мин в PBS. После этого проводили демаскировку антигенов, индуцированную нагреванием, в 10 mM щелочном цитратном буфере (pH = 9) при +95 °C на водяной бане TW-2.02 (Elmi, Латвия) в течение 15 мин. Затем срезы извлекали из буфера и охлаждали до комнатной температуры. После этого образцы трижды промывали в буферном растворе PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1 % Tween-20 (P9416-100 мл; Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Далее каждый срез покрывали буфером Protein Block (ab64226; Abcam, Великобритания) на 30 мин с последующим удалением избытка жидкости в соответствии с рекомендациями производителя.

После процедуры промывания и воздействия буфером Protein Block добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при температуре +4 °C во влажной темной камере. Используемая концентрация антител составляла 1:450 для анти-тирозингидроксилазы (tyrosine hydroxylase, TH) anti-TH (ab6211; Abcam). Для определения альфа-синуклеина добавляли 50 мкл первичного антитела alpha-Synuclein Antibody (NB110-61645, dilution, Novus Biologicals, Littleton, CO, США) в концентрации 1:600 и оставляли на 36 ч при температуре +4 °C во влажной темной камере. Затем срезы промывали в буфере PBS-Tween в течение 15 мин, удаляли избыток жидкости, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L AF488 (ab150077; Abcam) в концентрации 1:700, а потом оставляли во влажной темной камере на 2 ч при температуре +4 °C. Далее образцы промывали в буферном растворе PBS-Tween в течение 15 мин, удаляли избыток жидкости и помещали образцы в среду ProLong, Glass Antifade Mountant (Thermo P36982; Thermo Fisher Scientific). При оценке плотности альфа-синуклеина в нейронах с целью идентификации нейронов к срезам дополнительно добавляли 80 мкл DAPI (Maric et al., 2021) в течение 15 мин и затем дважды промывали PBS в течение 3 мин. После добавления антител срезы помещали в темную влажную камеру.

Анализ плотности нейронов. Оценку плотности нейронов, меченных антителами, проводили с помощью микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с камерой Zeiss AxioCam 506 mono (Carl Zeiss). Число меченых нейронов подсчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Плотность нейронов рассчитывали как число нейронов на объем (мм^3), как описано ранее (Рожкова и др., 2023).

Статистический анализ. Анализ результатов выполняли с использованием программного пакета STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Данные представлены как медиана (Me) с первым (q1) и третьим (q3) квартилями – Me [Q1;Q3]. Поведенческие данные (медиана трех сессий) и плотность нейронов сравнивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Уровень значимости считали при $p < 0.05$.

Результаты

Данные теста РР представлены на рис. 1. Статистический анализ с применением критерия Манна–Уитни не показал отличий по латентному времени на момент падения животного у линии B6.Cg-Tg по сравнению с сибсами дикого типа. Результаты по плотности нейронов, меченных антителами против TH в ЧС (SNC), показаны

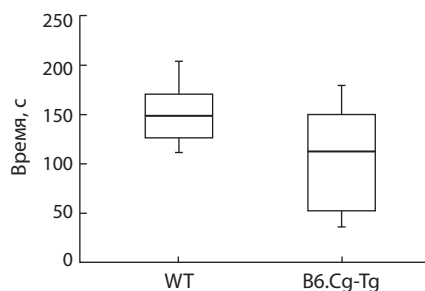


Рис. 1. Латентное время до падения в тесте PP самцов sibсов мышей дикого типа (wild type, WT) и B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев.

на рис. 2. Статистический анализ выявил, что мыши B6.Cg-Tg имеют более низкую плотность дофаминовых нейронов ($p < 0.05$) по сравнению с диким типом (0.92×10^5 [0.86×10^5 ; 0.93×10^5] против 1.25×10^5 [1.00×10^5 ; 1.26×10^5]). Данные по плотности нейронов с альфа-синуклеином в ЧС приведены на рис. 3. Статистический анализ показал увеличение числа нейронов с альфа-синуклеином в ЧС ($p < 0.01$) у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с диким типом (0.55×10^5 [0.53×10^5 ; 0.56×10^5] против 0.29×10^5 [0.23×10^5 ; 0.31×10^5]).

Обсуждение

Тест PP часто применяют для оценки локомоторной активности и общей двигательной функции у мышей с нейродегенеративными расстройствами (Graham, Sidhu, 2010; Oaks et al., 2013; Seo et al., 2020). Поскольку изменение двигательной активности у мышей с мутацией A53T начинает проявляться в

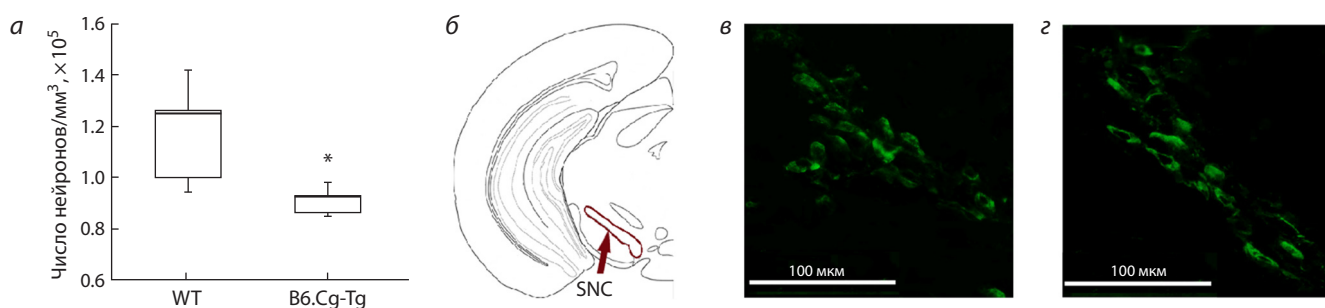


Рис. 2. Плотность дофаминергических нейронов в черной субстанции (substantia nigra – SNC), нейроны мечены антителами против тирозин-гидроксилазы (tyrosine hydroxylase, TH).

а – число нейронов в 1 мм^3 (* $p < 0.05$); б – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. Микрофотографии срезов в данной области: в – дикий тип (wild type, WT); з – B6.Cg-Tg.

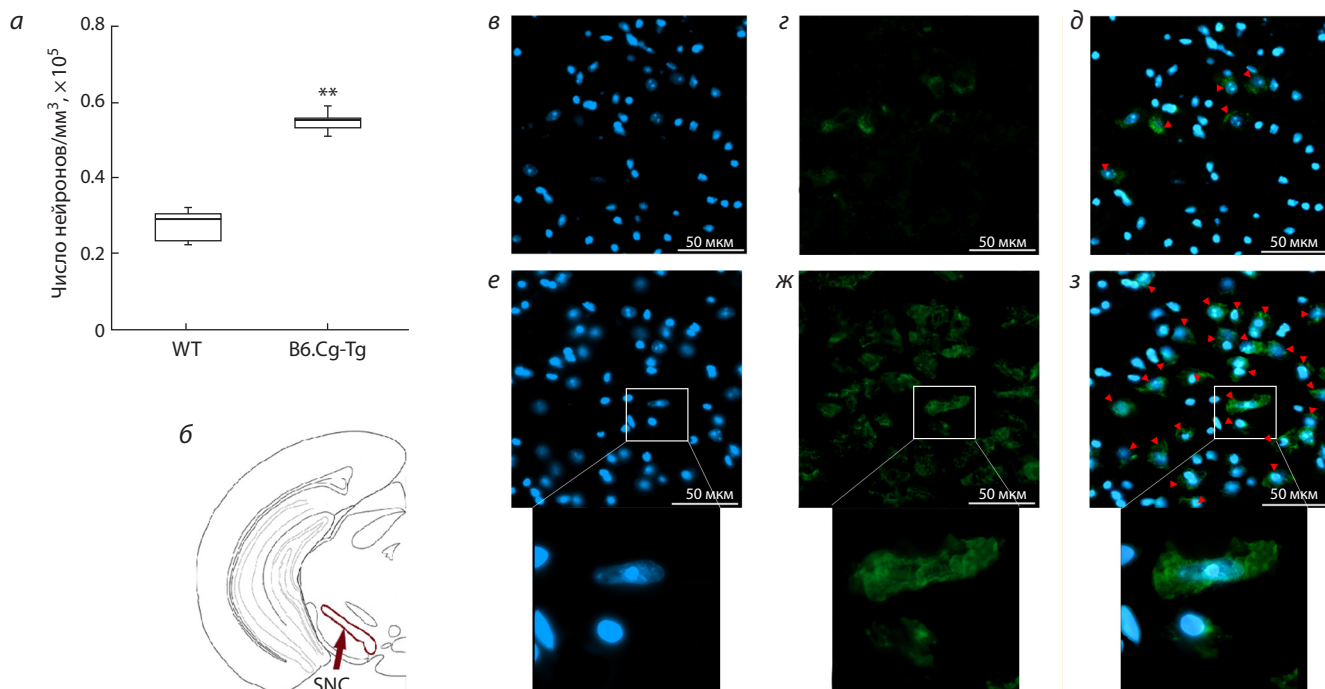


Рис. 3. Плотность нейронов с альфа-синуклеином в черной субстанции (substantia nigra – SNC), нейроны мечены антителами против альфа-синуклеина, ядра нейронов окрашены DAPI.

а – число нейронов в 1 мм^3 (** $p < 0.01$); б – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. Микрофотографии срезов мозга данной области: в–д – WT; е–з – B6.Cg-Tg; в, е – DAPI; ж, з – альфа-синуклеина; д, з – совмещенные изображения. Наконечники стрелок указывают на нейроны с включениями альфа-синуклеина. Белые боксы выделяют область, показанную при большем увеличении.

возрасте от 2 до 12 месяцев, что связано с повышением накопления альфа-синуклеина в нейронах головного мозга (Unger et al., 2006; Graham, Sidhu, 2010; Wang et al., 2022), то считается, что поведенческое тестирование желательно осуществлять именно в этот период (Zhang et al., 2019). В работе на мышах A53T-a-Syn в разном возрасте проводили девять сессий теста РР в течение трех дней и рассчитывали средние значения (Oaks et al., 2013). После сравнения полученных величин было показано, что координация движений у мышей A53T-a-Syn была хуже, чем у контрольных животных, уже в возрасте 2 и 4 месяцев (Oaks et al., 2013).

Сходные результаты были получены у двухмесячных мышей других трансгенных линий с геном *SNCA* и мутацией A53T при применении теста РР (Zhang et al., 2019), однако с возрастом у этих животных происходили выравнивание и даже инверсия этого показателя (Graham, Sidhu, 2010). В настоящем исследовании, как и в опубликованной ранее работе J.H. Seo с коллегами (2020), не обнаружено различий по координации движений и их баланса между мышами B6.Cg-Tg и сибсами дикого типа в тесте РР с ускорением в возрасте шести месяцев. Действительно, в зависимости от линии мышей, моделирующих БП, изменения локомоторной активности могут как проявляться в более раннем возрасте (Oaks et al., 2013; Zhang et al., 2019), так и возникать только у стареющих особей (Graham, Sidhu, 2010; Seo et al., 2020). Как показали полученные нами данные, на ранних этапах развития патологии у мышей линии B6.Cg-Tg нарушений моторных функций не наблюдается, что указывает на сходство с данной патологией у человека, поскольку у людей с БП двигательные расстройства возникают ближе к старости, когда патология начинает прогрессировать (Halliday et al., 2006).

Известно, что при БП появляются нарушения в nigrostriарном пути (Dickson et al., 2009; Beitz, 2014; Hayes, 2019). Патология структур данной системы головного мозга выступает в качестве важного маркера БП как у человека, так и у животных, моделирующих данное заболевание (Kato, Kimura, 1992; Unger et al., 2006; Beitz, 2014; Taguchi et al., 2020). В нашей предыдущей работе установлено снижение общего числа нейронов в ЧС у самцов линии B6.Cg-Tg (Рожкова и др., 2023). В настоящем исследовании у этих мышей было обнаружено меньше дофаминовых нейронов в этой области по сравнению с сибсами дикого типа. Ранее на модели БП, а именно на мышах линии BAC-SNCA^{A53T/-}, было показано уменьшение числа TH-позитивных нейронов в ЧС (Taguchi et al., 2020). Кроме того, у мышей линии A53T-Tg наблюдали снижение ответной реакции при попытках терапевтического воздействия дофамином (Unger et al., 2006). Известно, что дофаминовые нейроны ЧС участвуют в регуляции двигательной активности (Schultz et al., 1983). Между тем в нашем исследовании у мышей линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев не обнаружено двигательных расстройств, однако двигательные нарушения могут проявиться в более позднем возрасте (Chia et al., 2020).

В настоящей работе выявлено большее число нейронов с альфа-синуклеином в ЧС у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с сибсами дикого типа, что также характерно для БП

человека (Dickson, 2018; Bae et al., 2021). Данная особенность характерна для различных линий мышей, которых используют в качестве моделей БП (Van der Putten et al., 2000; Taguchi et al., 2020; Wang et al., 2022). В частности, подобный результат получен на мышах некоторых линий с трансгеном *SNCA* и мутацией A53T, у которых в ЧС было обнаружено больше олигомеров альфа-синуклеина начиная с возраста трех месяцев (Taguchi et al., 2020; Wang et al., 2022). Было продемонстрировано, что у мышей Pitx3-A53Ta-Syn в возрасте от 6 до 18 месяцев накопление альфа-синуклеина в ЧС повышается по сравнению с контролем C57BL, что сопровождается значительной дегенерацией парвальбумин-положительных нейронов (Zheng et al., 2022). Кроме того, была обнаружена связь между наличием включений альфа-синуклеина в нейронах и их гибелью (Kalia et al., 2013).

Существуют токсичные олигомеры альфа-синуклеина, способствующие изменению экспрессии белков в клетке, а также нарушению работы эндоплазматического ретикулума (Kalia et al., 2013). Вероятнее всего, важно накопление именно мутантного альфа-синуклеина в нейронах головного мозга, что приводит к симптомам БП, так как именно мутантные формы альфа-синуклеина как с мутацией A53T, так и с мутацией A30P становятся менее растворимыми (Григорян, Базян, 2007). Наше исследование показало, что увеличение числа нейронов с альфа-синуклеином в ЧС у мышей B6.Cg-Tg имеет место уже в возрасте шести месяцев.

Заключение

В этом исследовании охарактеризована линия мышей B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J в возрасте шести месяцев по таким важным для проявления БП маркерам, как координация движений и баланс тела, а также плотности дофаминовых нейронов и нейронов с альфа-синуклеином в черной субстанции. Мыши линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев имеют некоторые симптомы начала развития БП, такие как накопление мутантного альфа-синуклеина и уменьшение числа дофаминовых нейронов в черной субстанции головного мозга. Полученные данные позволяют рассматривать мышей линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев в качестве адекватной модели для изучения ранней стадии БП человека.

Список литературы / References

- Григорян Г.А., Базян А.С. Экспериментальные модели болезни Паркинсона на животных. *Успехи физиол. наук.* 2007;38:80-88 [Grigoryan G.A., Bazyan A.S. The experimental models of Parkinson's disease in animals. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Progress in Physiological Science.* 2007;38:80-88 (in Russian)]
- Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А., Лебедева Д.А., Козенева В.С., Хоцкин Н.В., Амтиславский С.Я. Анализ поведения и плотности нейронов в головном мозге мышей B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J – модели болезни Паркинсона. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2023;109:1199-1216. DOI 10.31857/S0869813923090091
- [Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Rakhmanova T.A., Lebedeva D.A., Kozeneva V.S., Khotkin N.V., Amstislavsky S.Ya. Analysis of behavior and brain neuronal density in B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J mice modeling a Parkinson's disease. *Ros-*

- siyskiy *Fiziologicheskii Zhurnal imeni I.M. Sechenova* = *Russian Journal of Physiology*. 2023;59:1633-1647. DOI 10.31857/S0869813923090091 (in Russian)]
- Bae Y.J., Kim J.M., Sohn C.H., Choi J.H., Choi B.S., Song Y.S., Nam Y., Cho S.J., Jeon B., Kim J.H. Imaging the substantia nigra in Parkinson disease and other Parkinsonian syndromes. *Radiology*. 2021;300:260-278. DOI 10.1148/radiol.2021203341
- Beitz J.M. Parkinson's disease: a review. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*. 2014;6:65-74. DOI 10.2741/S415
- Bidesi N.S., Vang Andersen I., Windhorst A.D., Shalgunov V., Herth M.M. The role of neuroimaging in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2021;159:660-689. DOI 10.1111/jnc.15516
- Burre J., Sharma M., Sudhof T.C. Cell biology and pathophysiology of α -synuclein. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med*. 2018;8:a024091. DOI 10.1101/cshperspect.a024091
- Case L.K., Del Rio R., Bonney E.A., Zachary J.F., Blankenhorn E.P., Tung K.S., Teuscher C. The postnatal maternal environment affects autoimmune disease susceptibility in A/J mice. *Cell Immunol*. 2010; 260:119-127. DOI 10.1016/j.cellimm.2009.10.002
- Chen D., Liu Y., Shu G., Chen C., Sullivan D.A., Kam W.R., Hann S., Fowler M., Warman M.L. Ocular manifestations of chordin-like 1 knockout mice. *Cornea*. 2020;39:1145-1150. DOI 10.1097/ICO.0000000000002371
- Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:2464. DOI 10.3390/ijms21072464
- Crabtree D.M., Zhang J. Genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res. Bull*. 2012;88:13-32. DOI 10.1016/j.brainresbull.2011.07.019
- Deutch A.Y. Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl*. 2006;70:67. DOI 10.1007/978-3-211-45295-0_12
- Dickson D.W. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2018;46:S30-S33. DOI 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033
- Dickson D.W., Braak H., Duda J.E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday G.M., Hardy J., Leverenz J.B., Del Tredici K., Wszolek Z.K., Litvan I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009;8:1150-1157. DOI 10.1016/S1474-4422(09)70238-8
- Graham D.R., Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human α -synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J. Neurosci. Res*. 2010;88:1777-1183. DOI 10.1002/jnr.22331
- Halliday G.M., Del Tredici K., Braak H. Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl*. 2006;70:99. DOI 10.1007/978-3-211-45295-0_16
- Hayes M.T. Parkinson's disease and parkinsonism. *Am. J. Med*. 2019; 132:802-807. DOI 10.1016/j.amjmed.2019.03.001
- Holmdahl R., Malissen B. The need for littermate controls. *Eur. J. Immunol*. 2012;42:45-47. DOI 10.1002/eji.201142048
- Jellinger K.A. Pathology of Parkinson's disease. *Mol. Chem. Neuro-path*. 1991;14:153-197. DOI 10.1007/bf03159935
- Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J., Lozano A.M., Lang A.E. α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol*. 2013;73:155-169. DOI 10.1002/ana.23746
- Kato M., Kimura M. Effects of reversible blockade of basal ganglia on a voluntary arm movement. *J. Neurophysiol*. 1992;68:1516-1534. DOI 10.1152/jn.1992.68.5.1516
- Korhounov A., Meyer M.F., Krasnianski M. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2010;117:1359-1369. DOI 10.1007/s00702-010-0454-z
- Korolenko T.A., Shintyapina A.B., Belichenko V.M., Pupyshev A.B., Akopyan A.A., Fedoseeva L.A., Russkikh G.S., Vavilin V.A., Tenednik M.V., Lin C.-L., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Early Parkinson's disease-like pathology in a transgenic mouse model involves a decreased Cst3 mRNA expression but not neuroinflammatory response in the brain. *Med. Univer*. 2020;3:66-78. DOI 10.2478/medu-2020-0008
- Lai T.T., Kim Y.J., Nguyen P.T., Koh Y.H., Nguyen T.T., Ma H.I., Kim Y.E. Temporal evolution of inflammation and neurodegeneration with α -synuclein propagation in Parkinson's disease mouse model. *Fron. Int. Neurosci*. 2021;15:715190. DOI 10.3389/fnint.2021.715190
- Langley M.R., Ghaisas S., Palanisamy B.N., Ay M., Jin H., Anantharam V., Kanthasamy A., Kanthasamy A.G. Characterization of non-motor behavioral impairments and their neurochemical mechanisms in the MitoPark mouse model of progressive neurodegeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol*. 2021;341:113716. DOI 10.1016/j.expneurol.2021.113716
- Lee F.J., Liu F., Pristupa Z.B., Niznik H.B. Direct binding and functional coupling of α -synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J*. 2001;15:916-926. DOI 10.1096/fj.00-0334com
- Liu Q., Xu Y., Wan W., Ma Z. An unexpected improvement in spatial learning and memory ability in α -synuclein A53T transgenic mice. *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2018;125(2):203-210. DOI 10.1007/s00702-017-1819-3
- Maric D., Jahanipour J., Li X.R., Singh A., Mobiny A., Van Nguyen H., Sedlock A., Grama K., Roysam B. Whole-brain tissue mapping toolkit using large-scale highly multiplexed immunofluorescence imaging and deep neural networks. *Nat. Commun*. 2021;12:1550. DOI 10.1038/s41467-021-21735-x
- Nicholas L.M., Ozanne S.E. Early life programming in mice by maternal overnutrition: mechanistic insights and interventional approaches. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2019;374:20180116. DOI 10.1098/rstb.2018.0116
- Oaks A.W., Frankfurt M., Finkelstein D.I., Sidhu A. Age-dependent effects of A53T α -synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One*. 2013;8:e60378. DOI 10.1371/journal.pone.0060378
- Paumier K.L., Sukoff Rizzo S.J., Berger Z., Chen Y., Gonzales C., Kaftan E., Li L., Lotarski S., Monaghan M., Shen W., Stolyar P., Vasilyev D., Zaleska M., Hirst W.D., Dunlop J. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One*. 2013;8(8):e70274. DOI 10.1371/journal.pone.0070274
- Paxinos G., Franklin K. Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. San Diego: Acad. Press, 2012
- Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkmann J., Schrag A.E., Lang A.E. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017;3:17013. DOI 10.1038/nrdp.2017.13
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276:2045-2047. DOI 10.1126/science.276.5321.2045
- Pupyshev A.B., Korolenko T.A., Akopyan A.A., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant α -synuclein as an early event at synucleinopathy progression. *Neurosci. Lett*. 2018;672: 140-144. DOI 10.1016/j.neulet.2017.12.001
- Schultz W., Ruffieux A., Aebischer P. The activity of pars compacta neurons of the monkey substantia nigra in relation to motor activation. *Exp. Brain Res*. 1983;51:377-387. DOI 10.1016/0304-3940(84)90456-7
- Seo J.H., Kang S.W., Kim K., Wi S., Lee J.W., Cho S.R. Environmental enrichment attenuates oxidative stress and alters detoxifying enzymes in an A53T α -synuclein transgenic mouse model of Par-

- kinson's disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9:928. DOI 10.3390/antiox9100928
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388: 839-840. DOI 10.1038/42166
- Stern G. The effects of lesions in the substantia nigra. *Brain*. 1966;89: 449-478. DOI 10.1093/brain/89.3.449
- Taguchi T., Ikuno M., Hondo M., Parajuli L.K., Taguchi K., Ueda J., Sawamura M., Okuda S., Nakanishi E., Hara J., Uemura N., Hatanaka Y., Ayaki T., Matsuzawa S., Tanaka M., El-Agnaf O.M.A., Koike M., Yanagisawa M., Uemura M.T., Yamakado H., Takahashi R. α -Synuclein BAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hypsmia: a prodromal Parkinson's disease model. *Brain*. 2020;143:249-265. DOI 10.1093/brain/awz380
- Tang H., Gao Y., Zhang Q., Nie K., Zhu R., Gao L., Feng S., Wang L., Zhao J., Huang Z., Zhang Y., Wang L. Chronic cerebral hypoperfusion independently exacerbates cognitive impairment within the pathopoiesis of Parkinson's disease via microvascular pathologies. *Behav. Brain Res.* 2017;333:286-294. DOI 10.1016/j.bbr.2017.05.061
- Tikhonova M.A., Tikhonova N.G., Tenditnik M.V., Ovsyukova M.V., Akopyan A.A., Dubrovina N.I., Amstislavskaya T.G., Khlestkina E.K. Effects of grape polyphenols on the life span and neuroinflammatory alterations related to neurodegenerative Parkinson disease-like disturbances in mice. *Molecules*. 2020;25:5339. DOI 10.3390/molecules25225339
- Tran J., Anastacio H., Bardy C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinsons Dis.* 2020;6:8. DOI 10.1038/s41531-020-0110-8
- Unger E.L., Eve D.J., Perez X.A., Reichenbach D.K., Xu Y., Lee M.K., Andrews A.M. Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol. Dis.* 2006;21:431-443. DOI 10.1016/j.nbd.2005.08.005
- Van der Putten H., Wiederhold K.H., Probst A., Barbieri S., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W.P., Ruegg M.A., Lin S., Caroni P., Sommer B., Tolnay M., Bilbe G. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 2000;20: 6021-6029. DOI 10.1523/JNEUROSCI.20-16-06021.2000
- Venda L., Cragg S., Buchman V.L., Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2010;12:559-568. DOI 10.1016/j.tins.2010.09.004
- Wang Y., Sun Z., Du S., Wei H., Li X., Li X., Shen J., Chen X., Cai Z. The increase of α -synuclein and alterations of dynein in A53T transgenic and aging mouse. *J. Clin. Neurosci.* 2022;96:154-162. DOI 10.1016/j.jocn.2021.11.002
- Wu D., Dean J. Maternal factors regulating preimplantation development in mice. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2020;140:317-340. DOI 10.1016/bs.ctdb.2019.10.006
- Zhang Yu., Wu Q., Zhang L., Wang Q., Yang Z., Liu J., Feng L. Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy *in vitro* and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* 2019;150:104538. DOI 10.1016/j.phrs.2019.104538
- Zhang Yu., Wu Q., Ren Y., Zhang Y., Feng L. A53T α -synuclein induces neurogenesis impairment and cognitive dysfunction in line M83 transgenic mice and reduces the proliferation of embryonic neural stem cells. *Brain Res. Bull.* 2022;182:118-129. DOI 10.1016/j.brainresbull.2022.02.010
- Zheng M., Liu Y., Xiao Z., Jiao L., Lin X. Tau knockout and α -synuclein A53T synergy modulated parvalbumin-positive neurons degeneration staging in substantia nigra pars reticulata of Parkinson's disease-like model. *Front. Aging Neurosci.* 2022;13:784665. DOI 10.3389/fnagi.2021.784665

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.02.2024. После доработки 29.07.2024. Принята к публикации 02.08.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-83

Spatial genetic characterization of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the area between the Alps and the Central Dinaric Mountains

A. Devedžić¹, F. Urzi ^{ID}², B. Pokorny ^{ID}³, G. Vengušt ^{ID}⁴, D.Ž. Vengušt ^{ID}⁴, F. Janžekovič ^{ID}¹, L. Velić ^{ID}⁵, T. Eterović ^{ID}⁵, B.K. Stroil ^{ID}⁶, E. Bužan ^{ID}^{2,3} 

¹ Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Maribor, Maribor, Slovenia

² Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Information Technologies, University of Primorska, Koper, Slovenia

³ Faculty of Environmental Protection, Velenje, Slovenia

⁴ Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

⁵ Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

⁶ Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

 elena.buzan@upr.si

Abstract. Red fox, *Vulpes vulpes*, is a globally distributed species characterized by its high adaptability to diverse habitats and a broad range of food resources. This remarkable adaptability has allowed the red fox to thrive in various environments, from urban areas to remote wilderness. In this study, we used a set of microsatellite markers for the comparative genetic analysis of red fox populations from two countries. We included populations from the Eastern Alps and the northern Dinaric Mountains in Slovenia, as well as the Central Dinaric Mountains in Bosnia and Herzegovina. We successfully isolated DNA and genotyped 118 red fox samples. Our analyses, which included Bayesian clustering techniques, revealed a weak genetic differentiation among the studied populations. However, it is noteworthy that statistically significant differences in estimates of genetic differentiation were only apparent when comparing the populations between the two countries. Further spatial genetic clustering analyses provided additional insights, unveiling a differentiation into four genetic clusters. These clusters comprised two distinct groups in Bosnia and Herzegovina and two in Slovenia. This pattern of differentiation suggests that isolation by distance is a key factor influencing the genetic structure of the red fox in this studied region. Additionally, our findings highlighted that populations from the Alps and northern Dinaric Mountains exhibit higher genetic diversity and observed heterozygosity compared to their counterparts in the Central Dinaric Mountains. The genetic diversity is also notable when compared to other European red fox populations. Studying genetic diversity is crucial for the resilience and adaptability of populations, ensuring their survival amid environmental changes and human-induced pressures.

Key words: red fox; *Vulpes vulpes*; microsatellites; genetic diversity; Dinaric Mountains.

For citation: Devedžić A., Urzi F., Pokorny B., Vengušt G., Vengušt D.Ž., Janžekovič F., Velić L., Eterović T., Stroil B.K., Bužan E. Spatial genetic characterization of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the area between the Alps and the Central Dinaric Mountains. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):752-758. DOI 10.18699/vjgb-24-83

Funding. This study was funded by: (i) the Slovenian Research and Innovation Agency (ARIS; programme groups P1–03861, P1–0403); (ii) the STEPCHANGE European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement No. 101006386.

Acknowledgements. We thank all the collaborators and founders who help accelerate collaboration with hunters as citizen scientists in wildlife monitoring and biodiversity research. We thank many hunters, foresters and other colleagues for collecting and providing the samples.

Authors' contribution. Conceptualization: E.B.; sample providing: B.P., D.Ž.V., G.V., L.V., T.E., B.K.S.; laboratory and statistical analyses: A.D., F.U., E.B.; writing – draft preparation: A.D., E.B., F.U.; writing – review and editing: A.D., E.B., B.P., F.U., F.J., B.K.S.; funding: E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Пространственная генетическая характеристика красной лисицы (*Vulpes vulpes*) в районе между Альпами и центральными Динарскими горами

А. Деведжич¹, Ф. Урзи ^{ID}², Б. Покорны ^{ID}³, Г. Венгушт ^{ID}⁴, Д.Ж. Венгушт ^{ID}⁴, Ф. Янжекович ^{ID}¹, Л. Велич ^{ID}⁵, Т. Этерович ^{ID}⁵, Б.К. Стройл ^{ID}⁶, Э. Бужан ^{ID}^{2,3} 

¹ Факультет естественных наук и математики, Университет Марибора, Марибор, Словения

² Факультет математики, естественных наук и информационных технологий, Приморский университет, Копер, Словения

³ Факультет охраны окружающей среды, Веленье, Словения

⁴ Ветеринарный факультет, Университет Любляны, Любляна, Словения

⁵ Факультет ветеринарной медицины, Университет Сараево, Сараево, Босния и Герцеговина

⁶ Институт геной инженерии и биотехнологии, Университет Сараево, Сараево, Босния и Герцеговина

 elena.buzan@upr.si

Аннотация. Красная лисица, *Vulpes vulpes*, – широко распространенный вид, характеризующийся высокой адаптивностью к различным средам обитания и широким спектром пищевых ресурсов. Удивительная адаптивность позволила красной лисице выживать в самых разнообразных условиях, от городских территорий до отдаленных диких мест. С использованием набора микросателлитных маркеров нами проведен сравнительный генетический анализ популяций красной лисицы из двух стран. В исследование включены популяции из Восточных Альп и северных Динарских гор в Словении, а также из центральных Динарских гор в Боснии и Герцеговине. Мы успешно выделили ДНК и генотипировали 118 образцов красной лисицы. Анализы, включавшие байесовские методы кластеризации, показали слабую генетическую дифференциацию между исследуемыми популяциями. Однако надо отметить, что статистически значимые различия в оценках генетической дифференциации были очевидны лишь при сравнении популяций между двумя странами. Дополнительные пространственные генетические анализы выявили разделение на четыре генетических кластера, которые включали две отдельные группы в Боснии и Герцеговине и две – в Словении. Такая картина дифференциации предполагает, что ключевым фактором, влияющим на генетическую структуру красной лисицы в данном регионе, является изоляция по расстоянию. Кроме того, наши результаты показали, что популяции из Альп и северных Динарских гор обладают более высокими генетическим разнообразием и наблюдаемой гетерозиготностью по сравнению с популяциями из центральных Динарских гор. Генетическое разнообразие заметно также при сравнении с другими европейскими популяциями красной лисицы. Изучение генетического разнообразия имеет важное значение для устойчивости и адаптируемости популяций, обеспечивая их выживание в условиях экологических изменений и антропогенного давления.

Ключевые слова: красная лисица; *Vulpes vulpes*; микросателлиты; генетическое разнообразие; Динарские горы.

Introduction

Red fox (*Vulpes vulpes*) is recognized as one of the most widespread terrestrial predators in Europe, potentially ranking among the most prevalent mammals (Hoffmann et al., 2004). Its extensive distribution across diverse European environments exposes the species to a spectrum of environmental and climatic conditions, contributing to variations in life strategies and fitness among populations (Nowak, 1999). Red fox exhibits adaptability across various habitats, including forests, tundra, prairies, deserts, mountains, agricultural lands, and urban areas. It is often regarded as a pest due to its perceived detrimental effects on prey populations and its capacity to transmit various diseases. In many European countries, it is considered an important game species (Atterby et al., 2015).

The species is native both in Slovenia and Bosnia and Herzegovina (B&H). In Slovenia, red fox is the most common and predominant wild carnivore, and populations are widespread from the Adriatic coast to the Prekmurje region. In the period 2014–2023, between 10,055 (in 2014) and 14,707 (in 2021) individuals were hunted annually, and reported roadkill in the same period was in the range from 686 (in 2023) to 1,177 (in 2019) individuals, respectively. Moreover, every year between approx. 200 and 300 red foxes were found dead either due to diseases (mainly sarcoptic mange) or unknown reasons (OSLIS, 2024). In B&H, red fox occupies a variety of habitats with an estimated density of around 0.5 individuals per km². Considering hunting data, it is estimated that about 24,000 foxes live in B&H, distributed over the entire country (Nemet, 2018).

Red fox populations exhibit pronounced lack of mitochondrial DNA (mtDNA) genetic structuring on a wide spatiotemporal scale (Fрати et al., 1998; Teacher et al., 2011; Edwards et al., 2012; Kutschera et al., 2013; McDevitt et al., 2022). The lack of phylogeographic structuring in red fox, based on mtDNA markers, has been attributed to its persistence outside the traditional refugia areas during the last glacial maximum (LGM), but several lines of evidence suggest survival of red fox phylogenetic lineages in southern refugia (Kutschera et al., 2013). Southern European regions generally have less species connectivity than northern ones, but populations still

show low differentiation (Fрати et al., 1998; Kirschning et al., 2007; Gachot-Neveu et al., 2009; Edwards et al., 2012). Other studies based on nuclear DNA markers confirmed low genetic diversity of red foxes in Europe, including Poland (Mullins et al., 2014), United Kingdom (Atterby et al., 2015), and Scandinavia (Norén et al., 2015). These studies also revealed significant genetic structure at smaller geographic scales, suggesting the formation of distinct subpopulations within regions.

Red fox genetic diversity, structure, and gene flow between populations are influenced by internal factors such as vagility and dispersion, and external factors like landscape and environment. Landscape features, such as rivers or mountain ranges, may restrict gene flow and impact genetic diversity of subpopulations (Manel et al., 2003; Kirschning et al., 2007; Valvo, 2011; Sommer S. et al., 2013; Galov et al., 2014; Balkenhol et al., 2015). Historical and current factors, including past population bottlenecks, range expansions, landscape features, and habitat fragmentation, collectively influence red fox population genetic diversity and structure (Fрати et al., 1998; Teacher et al., 2011; Edwards et al., 2012; Kutschera et al., 2013; Statham et al., 2014; McDevitt et al., 2022).

Two geographically wider and comparative studies (Zecchin et al., 2019; McDevitt et al., 2022) have already studied the genetic structure of red foxes in Slovenia. Zecchin et al. (2019) revealed that red foxes in Slovenia belong to a unified group together with the Croatian population, and that there is no spatially and temporally extensive phylogeographic structure of the species within Europe. Similarly, McDevitt et al. (2022) showed that the Slovenian red fox population belongs to the “Central Europe” cluster together with populations from Croatia and Serbia. Both studies used nuclear markers (microsatellites and single nucleotide polymorphisms, respectively) and underlined the importance of genomic data in identification of refugia regions and post-glacial expansions across Europe (e.g. the Balkans), while at the same time providing necessary insights on red fox genetic diversity and structure.

Red fox from Croatia was individually studied by Galov et al. (2014). They found a high degree of genetic diversity among individuals, indicating a wide range of genetic varia-

tion within the population. Despite mitochondrial haplotype diversity, which is among the highest of all European red fox populations, the study showed a remarkable lack of population structure, indicating extensive gene flow and interbreeding of red foxes in the country. The study by Kirschning et al. (2007) included red foxes from Serbia, and different mitochondrial haplotypes were found, demonstrating genetic structuring within the population. However, as with the neighbouring population from Croatia (Galov et al., 2014), a relatively low degree of genetic differentiation was found on nuclear genetic markers between different geographical regions within Serbia.

To date, there has been no research on the genetic structure of red fox in Bosnia and Herzegovina. Therefore, the primary aim of our study was to conduct an analysis of the genetic variability and structure of red fox populations in B&H in comparison with the Slovenian population. More broadly, we also attempted to establish conclusions regarding the connections with neighbouring populations from Croatia and Serbia.

Materials and methods

Study area and sampling. The study area included territories of B&H and Slovenia (Supplementary Material 1¹), covering an area of around 66,189 km² (Nemet, 2018; Hunting Association of Slovenia, 2021).

Animals used in the study were either legally harvested during the hunting season or collected as roadkill or natural death. No animal was shot or otherwise killed for the purposes of this study solely. Samples of harvested animals were collected by hunters or wildlife researchers immediately after harvest between 2019 and 2021. Tissue samples were preserved in 70 % ethanol and blood samples were stored at -20 °C until analysis. In line with our objectives, samples included in the analysis were collected in Slovenia ($n = 59$) and B&H ($n = 59$). The Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo and the Veterinary Faculty, University of Ljubljana, which oversee the rabies surveillance initiative in both countries, sent only negative samples for genetic analysis at the Molecular Ecology Laboratory at the University of Primorska.

DNA extraction and quality control. The extraction of DNA from collected samples was performed using the peqGOLD Blood & Tissue DNA Mini Kit (VWR International, LLC, Austria), following the manufacturer's instructions. The concentration and purity of DNA obtained were measured with a 3.0 Qubit Fluorometer using Invitrogen™ – Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Nineteen microsatellites (Supplementary Material 2), originally identified and screened in canine genome studies in red foxes and domestic dogs (Richman et al., 2001; Kukekova et al., 2004, 2007), were amplified in three multiplex PCR reactions with DNA Thermo Cyclor (Applied Biosystems). Amplification was carried out with ready-to-use KAPA2G Fast Multiplex Mix (Kapa Biosystems) in 15 µl of the reaction mixture containing 5 µl of template DNA (~25 ng DNA), and 0.2 mM final concentration for each primer used in the set. The amplification was performed under the following conditions: initial denaturation step at 95 °C for 3 minutes, followed by 30 cycles of denaturation for 35 seconds, annealing

at 58 °C for 35 seconds, extension at 72 °C for 35 seconds; a final extension step at 72 °C for 10 minutes.

The fragment analysis was performed on a SeqStudio sequencer (Thermo Fisher Scientific) using the GeneScan LIZ500 (-250) standard (Applied Biosystems). The results were validated with the software GENEMAPPER v.5.0 (Applied Biosystems). Null alleles and heterozygosity deficiency were assessed using FreeNA (Chapuis, Estoup, 2007), a program based on Dempster's algorithm, to avoid Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) deviation. GENEPOP 4.7 software (Rousset, 2008) was utilised to perform the exact test for heterozygosity deficiency, calculating the deviation from HWE and inbreeding coefficient (F_{IS}) estimates. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Genetic diversity parameters, including the number and richness of alleles, were computed using GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al., 2004), FSTAT 2.9.4 (Goudet, 1995), and GENEPOP 4.7 (Rousset, 2008). Pairwise fixation index (F_{ST}) between populations was assessed using the Weir and Cockerham algorithm (1984) in GENEPOP 4.7, employing 1,000 permutations for statistical rigour.

STRUCTURE 2.3.4 (Falush et al., 2003) was employed to determine population structure, assessing the probability of genetic interbreeding between individuals. The model considered the unique origin of each ancestor for a specific allele, providing the probability (Q) that each subject belongs to a particular cluster or group. For STRUCTURE, 10 independent cycles for each K (number of clusters) were conducted between 1 and 10, using a Markov chain model with 1,000,000 Markov Chain Model Monte Carlo (MCMC) iterations and 100,000 burn-in iterations for each cycle. We applied a mixed model featuring independent allele frequencies. Depending on the specific populations under investigation, we opted for the independent allele frequencies model, if the allele frequencies among distinct populations differ accordingly. The program STRUCTURE Harvester v0.6.94 (Earl, Vonholdt, 2014) was used to combine results and determine the most optimal K based on ΔK developed by Evanno et al. (2005), with results recorded using CLUMPP (Jakobsson, Rosenberg, 2007) and DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Discriminant analysis of principal components (DAPC) was employed to identify genetic clusters within the dataset using the Adegenet package (Jombart, 2008) in R 3.5.1 software (R Development Core Team, 2011). DAPC, a multivariate statistical method, reduces genetic data dimensionality through principal component analysis (PCA) and uses discriminant analysis to identify genetic clusters or subpopulations.

For spatial population structure analysis, a visual user interface (GUI) was developed in the R environment using Geneland 4.9.2 (Guillot et al., 2005). Geneland, a Bayesian method, employs MCMC simulations to estimate the number of genetic populations (K) and assigns individuals to populations based on genetic similarity, considering spatial autocorrelation and isolation by distance.

Arlequin ver. 3.5.2.2 (Excoffier, Lischer, 2010) was used for the analysis of molecular variance (AMOVA), providing techniques to test the genetic differences between individuals and populations and between the optimal number of clusters identified by STRUCTURE ($K=2$). Finally, we tested isolation by distance (IBD) patterns within all genetic populations

¹ Supplementary Materials 1–6 are available at:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx25.pdf>

through the Mantel test, comparing genetic and geographical distances. Euclidean distances were calculated using R 3.5.1 software (R Development Core Team, 2011) and the Adegenet library (Jombart, 2008). Significance was determined through 999 Monte Carlo simulations, evaluating the correlation between Edwards distances and Euclidean geographic distances.

Results

We visualised fox genotypes with GeneMapper v.5.0 software. Six monomorphic markers and six markers with high null allele frequencies (>20 %) were excluded. Monomorphic markers lack variation in DNA sequence length, while null alleles result in non-amplification of expected alleles in PCR tests. We then proceeded with statistical analyses on the remaining seven markers (V402, Vv-C01.424, VVM189, Vv-REN169O18, FH2541, Vv-INU055, and Vv-C08.618). The purpose of these exclusions is to ensure the accuracy of the results and prevent any unfair impact on the genetic variability parameters of the populations under study.

Genetic diversity within B&H and Slovenian red fox populations

Our findings revealed lower genetic diversity in the B&H population, i.e. evident in lower observed heterozygosity and allelic richness ($H_O = 0.648$, $AR = 7.538$) compared to the Slovenian population ($H_O = 0.770$, $AR = 9.724$). The genetic diversity in B&H was also lower than genetic diversity of red fox across Austria, Croatia, Italy, and Slovenia ($H_O = 0.75$, $AR = 12.6$) as reported by Zecchin et al. (2019). However, this difference could be a result of a higher number of microsatellites used in Zecchin et al. study, which is three times higher than in the present one. Conversely, compared to the analysed Slovenian population, the observed heterozygosity was lower but allelic richness was higher in this regional study of red foxes. The observed heterozygosity in B&H foxes was lower than observed heterozygosity of foxes from Poland ($H_O = 0.729$, $AR = 4.871$), even though they used only microsatellite markers (Mullins et al., 2014). In contrast, the Slovenian population displayed higher H_O and AR values compared to Polish population. Finally, both B&H and Slovenian populations had greater observed heterozygosity and allelic richness than red foxes from the United Kingdom (Atterby et al., 2015; 11 microsatellite loci: $H_O = 0.543$, $AR = 5.033$).

Genetic differentiation between B&H and Slovenian red foxes

Spatial genetic structure and genetic clustering depend on the software and analysis employed. For instance, STRUCTURE (Fig. 1) and Geneland identified two clusters ($K = 2$): one includes red fox from B&H and the other one samples from Slovenia (Supplementary Materials 3 & 4). On the contrary, DAPC analysis suggested four clusters ($K = 4$) (Fig. 2), dividing each countries' populations into two additional clusters. These discrepancies stem from different methodologies and assumptions inherent to each approach in population genetics analysis.

STRUCTURE estimates ancestry proportions and admixture based on genotypes, relying on assumptions like linkage equilibrium and HWE. DAPC employs dimensionality reduction and discriminant analysis for membership assign-



Fig. 1. Genetic structure of red fox populations in Slovenia (1) and B&H (2), determined by STRUCTURE.

Each individual is represented by a line proportionally partitioned into colour segments corresponding to its membership in particular cluster. K is the number of clusters.

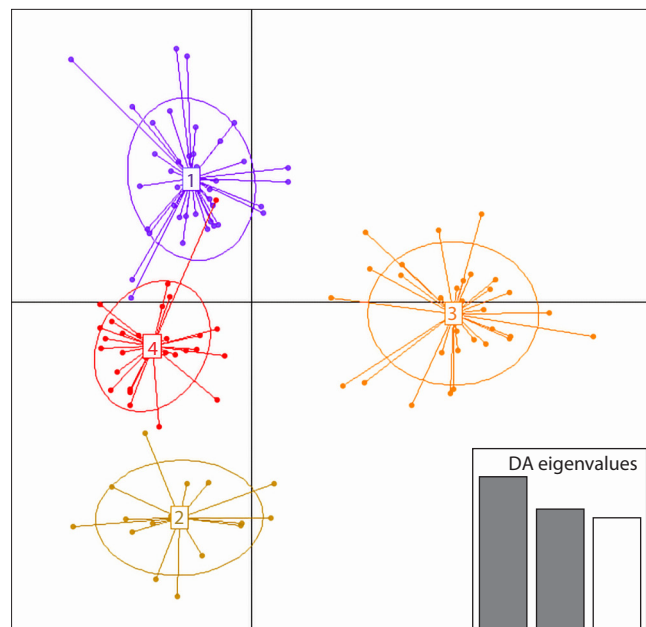


Fig. 2. The DAPC scatter plot shows the presence of four clusters ($K = 4$).

Cluster 1 includes red fox samples from Slovenia, while the Cluster 3 includes red fox samples from B&H. In the Clusters 2 and 4 we can find samples from both countries (Supplementary Material 5).

ment, emphasising differences between clusters. Geneland combines spatial and genetic clustering. All three methods confirmed spatial differentiation at the regional level, with a weaker structure or admixture identified by STRUCTURE and DAPC, possibly due to long-distance dispersal of red foxes. The assumption of HWE was violated in STRUCTURE and Geneland analyses, affecting quantitative estimates. However, due to geographic or ecological constraints, there may be subpopulations with limited gene flow, which geographic information system (GIS) image (Fig. 3) clearly revealed by combining our microsatellite data and sampling coordinates in both populations.

DAPC revealed that red foxes from Slovenia form a distinct cluster (Cluster 1), while Clusters 2, 3, and 4 are shared between both countries. Cluster 3, predominant in B&H individuals, displayed the most genetic variation. Cluster 2 was genetically closer to B&H, and Cluster 4 showed high similarity to Cluster 1, suggesting potential admixture between B&H and Slovenian red fox populations. Historical gene flow from Slovenia to the Balkans was supported by previous studies, aligning with post glacial colonisation patterns (Sommer R.S., Nadachowski, 2006).

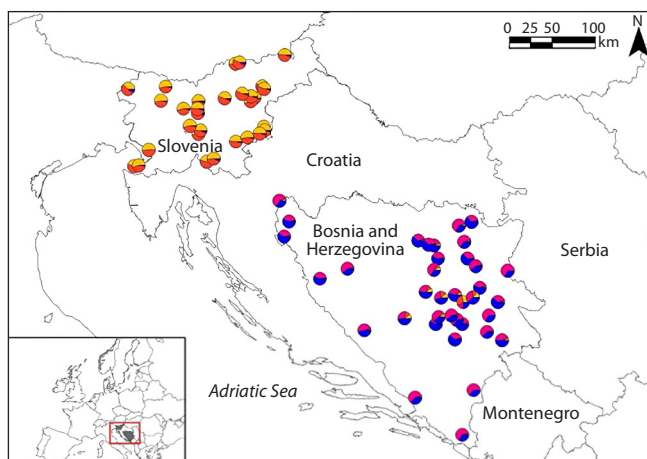


Fig. 3. Genetic structure of red fox in two studied countries based on the CLUMPP Q values and harvesting locations ($K = 4$ clusters).

Q values represent the proportion of individuals that are assigned to each cluster shown by GIS mapping (Supplementary Material 6).

AMOVA indicated genetic differentiation among populations and substantial within-individual variation. The F_{ST} value of 0.068 suggested significant but not highly differentiated populations, with 6.9 % of genetic variation attributed to differences between populations ($p < 0.001$).

IBD analysis demonstrated a positive correlation ($p < 0.001$, $R^2 = 0.13$; this correlation was higher than the randomly simulated p -value of 0.001) between genetic and geographic distances for B&H and Slovenian red fox populations, indicating differentiation due to limited dispersal, landscape barriers, habitat fragmentation, resource distribution, interactions with other species or human activities. However, we acknowledge the influence of factors like distance between B&H and Slovenia (almost 300 km). Understanding how habitat changes affect mobile species like red fox, especially in terms of genetic structure, remains an on-going challenge. Landscape history, barriers to movement, and migration rates can leave lasting genetic patterns and impact current population structures. Overall, our findings emphasise the importance of considering diverse analytical approaches and acknowledging the influence of geographical factors on genetic structure in red fox populations.

Discussion

We successfully revealed genetic structuring of the red fox populations between Alps and the Central Dinaric Mts. and showed weak genetic differentiation of the species in the studied area. Our findings are consistent with previous ones, which revealed the presence of a genetically unified red fox population in Slovenia (Zecchin et al., 2019; McDevitt et al., 2022). The DAPC analysis divided the Slovenian red foxes into two clusters, indicating the existence of possible sub-populations and admixture between the North Dinaric Mts. and the Prekmurje region, but this could also be a consequence of isolation by distance. Red foxes from B&H also belong to one STRUCTURE cluster, but the DAPC analysis divided them into two genetic clusters: first including the area of the Central Dinaric Mts. and second in the northern parts of the

country. The observed genetic structure by DAPC analysis can be attributed to various factors. The territory of B&H contains significant natural and anthropogenic barriers, such as mountain ranges and rivers, potentially leading to population isolation and genetic drift effects. The Dinaric Mts. along the western border with Croatia as well as internal mountain ranges may limit gene flow between Croatia and B&H. Galov et al. (2014) demonstrated the limiting effects of Istrian narrow land bridge and mountain altitudes above 1,000 m on fox migration in Croatia, which can also be the case for areas in B&H and Slovenia with many topographical similarities in studied habitats.

Although our results suggest limited gene flow between Slovenian and B&H red fox populations, the absence of Croatian samples hinders relevant conclusions. However, Zecchin et al. (2019) found a unified genetic structure of the fox in Croatia and Slovenia. Despite this, we can assume that there are some possible barriers to gene flow among foxes in the studied regions such as rivers like Sava, a tributary of the Danube, which forms the northern border between B&H and Croatia, and the Drina, which flows north and forms part of the eastern border between B&H and Serbia. The influence of rivers on red fox movement was also discussed in the population genetic analysis of Serbian red foxes by Kirschning et al. (2007). The study highlighted the role of the two major rivers, the Danube and the Tisza, which flow through Serbia, as potential barriers to fox migration. There are also anthropogenic barriers that lead to genetic isolation of foxes in B&H, such as the highway that crosses Croatia and runs through the north-western part of the border between B&H and Croatia.

The existence of two genetic groups of red fox between Alps and northern Dinaric Mts. and other in the Central Dinaric Mts. was previously showed by Zecchin et al. (2019), who identified separated clusters in Friuli Venezia Giulia region as a border area in which circulating individuals are genetically more like those from Slovenia and Croatia than to those of the remaining areas of north-eastern Italy. As a support to our results, a phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome b and D-loop by Statham et al. (2014) identified a clear differentiation between Italian red foxes and the red fox populations from the Balkans and Eastern Europe. Our results indicated that the B&H population belongs to the Balkan cluster according to mtDNA but additional analysis is needed to confirm this assumption.

The limited number of genetic markers used in our study likely influenced the Bayesian genetic structure analysis, resulting in an inability to distinctly separate subgroups by STRUCTURE and Geneland analysis (Falush et al., 2003). This limitation becomes more evident when compared to the clearer subgroup differentiation observed in the DAPC analysis. On the other hand, the landscape barriers such as rivers and lower mountains might not restrict gene flow among foxes in Slovenia, Croatia, and B&H. Indeed, in the studied area there is adequate habitat connectivity for red fox, therefore it seems that landscape characteristics do not cause important barriers to gene flow, resulting in lack of population differentiation in this species (Kirschning et al., 2007). This can also be confirmed by weak phylogeographic structuring of red fox on much larger geographic scales, such as within the Holarctic lineage (Kutschera et al., 2013).

Despite Galov et al. (2014) identified significant mtDNA genetic structure of red fox on the Istrian Peninsula, which borders coastal Slovenia, our data did not reveal similar genetic differentiation in the Slovenian population. This could likely be due to stable connectivity with neighbouring Italian population and the rest of the Slovenian population. However, it might also be due to variety of markers used in both studies.

Red foxes in Bosnia and Herzegovina have lower genetic diversity comparing to Slovenian and other European populations, which could be a consequence of a recent population decline due to rabies epidemics, compared to Slovenia and Croatia, where oral vaccination programmes (ORV) of foxes led to the control of the rabies epidemic (Rabies Bulletin Europe, 2017). Indeed, since the implementation of the ORV campaign in Slovenia (in 1988) and Croatia (in 2011), the number of rabies cases have been decreasing consistently with no cases detected since 2015 (Bedecković et al., 2016; Picot et al., 2017). The last rabies case in Slovenia was recorded in 2013, whereas in B&H was present until 2020. There, the lack of economic resources has led to a lack of continuous ORV, resulting in continued rabies hotspots in B&H (Tasioudi et al., 2014; Lojkić et al., 2021). Non-suitable disease management may lead to decrease in population size and influence the genetic diversity in the B&H red fox population, both in terms of allelic richness and observed heterozygosity compared to Slovenian population.

The statistically significant p -values for the F_{IS} estimates in Slovenia and B&H red fox population ($p = 0.37$ and $p = 0.13$, respectively) can be associated with historical bottlenecks due to diseases but also with possible regional isolation of populations (which was not revealed in our study, possible due to limited number of markers), leading to lower observed heterozygosity.

The results of AMOVA suggested existing genetic differences among populations. High genetic variation among individuals within sampled populations suggests substantial gene flow between them. However, the high level of genetic diversity within populations may suggest that maintaining habitat connectivity is an important factor in promoting gene flow and maintaining genetic variation within populations. These values demonstrate statistically significant differentiation between observed locations; however, it is crucial to acknowledge that the interpretation can vary based on factors like the particular genetic markers employed, the sampling strategy adopted, and the genetic structure inherent in the populations.

The significant IBD values among populations indicate a pattern of isolation by distance, attributed to missing data from neighbouring populations in Croatia. Assuming that the distance between the closest locations in the two countries exceeds several hundred kilometres, the observed genetic divergence is probably consequence of an isolation by distance. Considering also the DAPC analysis, which also confirmed shared genetic makeup between populations despite the distance, as has also been demonstrated in a study from Poland (Mullins et al., 2014).

Our findings are consistent with those of Teacher et al. (2011), who reported a small degree of isolation by distance, in mitochondrial control region, and a wide-scale absence of phylogeographic structure based on cytochrome b data, in red

foxes in Western Europe. The species' versatility and capacity to adapt to a broad range of habitats, along with a comparatively high degree of dispersal in both males and females, are suggested to be the main reasons for the low level of genetic structure observed (Teacher et al., 2011).

Conclusion

This study enhanced our understanding of the red fox genetic structure in the region encompassing the Eastern Alps and the Dinaric Mountains. In alignment with previous research, we found the absence of a pronounced genetic structure within the red fox population in this area. Populations from Slovenia and B&H showed low level of genetic differentiation, with significant differences found only when comparing populations in countries.

References

- Atterby H., Allnutt T.R., MacNicol A.D., Jones E.P., Smith G.C. Population genetic structure of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the UK. *Mamm. Res.* 2015;60:9-19. DOI 10.1007/s13364-014-0209-6
- Balkenhol N., Cushman S.A., Storfer A., Waits L.P. Introduction to landscape genetics – concepts, methods, applications. In: Landscape Genetics. Ch. 1. John Wiley & Sons Ltd., 2015;1-8. DOI 10.1002/9781118525258.ch01
- Bedecković T., Šimić I., Krešić N., Lojkić I., Mihaljević Ž., Sućec I., Janković I.L., Hostnik P. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. *BMC Vet. Res.* 2016;12(1):76. DOI 10.1186/s12917-016-0701-0
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. GENETIX 4.05. Population Genetics Software for Windows TM. Univ. of Montpellier, 2004
- Chapuis M.P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 2007;24(3):621-631. DOI 10.1093/molbev/msl191
- Earl D.A., Vonholdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2014;4:359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7
- Edwards C.J., Soulsbury C.D., Statham M.J., Ho S.Y., Wall D., Dolf G., Iossa G., Baker P.J., Harris S., Sacks B.N., Bradley D.G. Temporal genetic variation of the red fox, *Vulpes vulpes*, across western Europe and the British Isles. *Quat. Sci. Rev.* 2012;57:95-104. DOI 10.1016/j.quascirev.2012.10.010
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14:2611-2620
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 2010;10(3):564-567. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics.* 2003;164(4):1567-1587. DOI 10.1093/genetics/164.4.1567
- Fraiti F., Hartl G.B., Lovari S., Delibes M., Markov G. Quaternary radiation and genetic structure of the red fox *Vulpes vulpes* in the Mediterranean Basin, as revealed by allozymes and mitochondrial DNA. *J. Zool.* 1998;245(1):43-51. DOI 10.1111/j.1469-7998.1998.tb00070.x
- Gachot-Neveu H., Lefevre P., Roeder J.J., Henry C., Pouille M.L. Genetic detection of sex-biased and age-biased dispersal in a population of wild carnivore, the red fox, *Vulpes vulpes*. *Zoolog. Sci.* 2009;26(2):145-152. DOI 10.2108/zsj.26.145
- Galov A., Sindičić M., Andreanszky T., Čurković S., Deždek D., Slavica A., Hartl G.B., Krueger B. High genetic diversity and low po-

- pulation structure in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Croatia. *Mamm. Biol.* 2014;79(1):77-80. DOI 10.1016/j.mambio.2013.10.003
- Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 1995;86(6):485-486. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627
- Guillot G., Mortier F., Estoup A. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes.* 2005;5(3):712-715. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x
- Hoffmann M., Macdonald D.W., Sillero-Zubiri C. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. Gland: IUCN, 2004
- Hunting Association of Slovenia. Information centre data. Available online: <https://www.lovska-zveza.si/wp-content/uploads/2022/05/Letno-porocilo-LZS-2021-za-splet.pdf>. Accessed on 5 January 2024
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 2007; 23(14):1801-1806. DOI 10.1093/bioinformatics/btm233
- Jombart T. *ade4*: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.* 2008;24(11):1403-1405. DOI 10.1093/bioinformatics/btn129
- Kirschning J., Zachos F.E., Cirovic D., Radovic I.T., Hmwe S.S., Hartl G.B. Population genetic analysis of Serbian red foxes (*Vulpes vulpes*) by means of mitochondrial control region sequences. *Biochem. Genet.* 2007;45(5-6):409-420. DOI 10.1007/s10528-007-9082-1
- Kukekova A.V., Trut L.N., Oskina I.N., Kharlamova A.V., Shikhevich S.G., Kirkness E.F., Aguirre G.D., Acland G.M. A marker set for construction of a genetic map of the silver fox (*Vulpes vulpes*). *J. Hered.* 2004;95(3):185-194. DOI 10.1093/jhered/esh033
- Kukekova A.V., Trut L.N., Oskina I.N., Johnson J.L., Temnykh S.V., Kharlamova A.V., Shepeleva D.V., Gulievich R.G., Shikhevich S.G., Graphodatsky A.S., Aguirre G.D., Acland G.M. A meiotic linkage map of the silver fox, aligned and compared to the canine genome. *Genome Res.* 2007;17(3):387-399. DOI 10.1101/gr.5893307
- Kutschera V.E., Lecomte N., Janke A., Selva N., Sokolov A.A., Haun T., Steyer K., Nowak C., Hailer F. A range-wide synthesis and timeline for phylogeographic events in the red fox (*Vulpes vulpes*). *BMC Evol. Biol.* 2013;13(1):114. DOI 10.1186/1471-2148-13-114
- Lojkić I., Šimić I., Bedeković T., Krešić N. Current status of rabies and its eradication in Eastern and Southeastern Europe. *Pathogens.* 2021;10(6):742. DOI 10.3390/pathogens10060742
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 2003;18(4):189-197. DOI 10.1016/S0169-5347(03)00008-9
- McDevitt A.D., Coscia I., Browett S.S., Ruiz-González A., Statham M.J., Ruczyńska I., Panek M., Korolev A., Okhlopkov I.M., Saveljev A.P., Pokorný B., Flajšman K., Harrison S.W.R., Lobkov V., Čirović D., Mullins J., Pertoldi C., Randi E., Sacks B.N., Kowalczyk R., Wójcik J.M. Next-generation phylogeography resolves post-glacial colonization patterns in a widespread carnivore, the red fox (*Vulpes vulpes*), in Europe. *Mol. Ecol.* 2022;31(3):993-1006. DOI 10.1111/mec.16276
- Mullins J., McDevitt A.D., Kowalczyk R., Ruczyńska I., Górny M., Wójcik J.M. The influence of habitat structure on genetic differentiation in red fox populations in north-eastern Poland. *Acta Theriol.* 2014;59(3):367-376. DOI 10.1007/s13364-014-0180-2
- Nemet A. Evaluation of the Sensitivity of the System of Passive Control of Rabies in Bosnia and Herzegovina. Master thesis. Univ. of Sarajevo, 2018
- Norén K., Statham M.J., Ågren E.O., Isomursu M., Flagstad Ø., Eide N.E., Berg T.B.G., Bech-Sanderhoff L., Sacks B.N. Genetic footprints reveal geographic patterns of expansion in Fennoscandian red foxes. *Global Change Biol.* 2015;21(9):3299-3312. DOI 10.1111/gcb.12922
- Nowak R.M. Walker's Mammals of the World. Johns Hopkins Univ. Press, 1999
- OSLIS (Osrednji Slovenski Lovski Informacijski Sistem). Available online: <http://oslis.gozdis.si/>. Accessed on 6 May 2024
- Picot V., Rasuli A., Abella-Rider A., Saadian-Elahi M., Aikim-bayev A., Barkia A., Benmaiz S., Bouslama Z., De Balogh K., Dehove A., Davlyatov F., Farahtaj F., Gongal G., Gholami A., Imnadze P., Issad M., Khoufi S., Nedosekov V., Rafila A., Rich H., Soufi A., Tuychiev J., Vranjes N., Vodopija R., Zaouia I., Nel L. The Middle East and Eastern Europe rabies Expert Bureau (MEEREB) third meeting: Lyon, France (7-8 April, 2015). *J. Infect. Public Health.* 2017;10(6):695-701. DOI 10.1016/j.jiph.2017.03.005
- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2011. <http://www.R-project.org>
- Rabies Bulletin Europe. Available online: <https://www.who-rabies-bulletin.org/news/re-emergence-rabies-bosnia-herzegovina>. Accessed on December 2017
- Richman M., Mellersh C.S., André C., Galibert F., Ostrander E.A. Characterization of a minimal screening set of 172 microsatellite markers for genome-wide screens of the canine genome. *J. Biochem. Biophys.* 2001;47(1-2):137-149. DOI 10.1016/s0165-022x(00)00160-3
- Rosenberg N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes.* 2004;4(1):137-138. DOI 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Rousset F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 2008;8(1):103-106. DOI 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Sommer R.S., Nadachowski A. Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Rev.* 2006;36(4):251-265. DOI 10.1111/j.1365-2907.2006.00093.x
- Sommer S., McDevitt A.D., Balkenhol N. Landscape genetic approaches in conservation biology and management. *Conserv. Genet.* 2013;14(2):249-251. DOI 10.1007/s10592-013-0473-z
- Statham M.J., Murdoch J., Janecka J., Aubry K.B., Edwards C.J., Soulsbury C.D., Berry O., Wang Z., Harrison D., Pearch M., Tomsett L., Chupasko J., Sacks B.N. Range-wide multilocus phylogeography of the red fox reveals ancient continental divergence, minimal genomic exchange and distinct demographic histories. *Mol. Ecol.* 2014;23(19):4813-4830. DOI 10.1111/mec.12898
- Tasioudi K.E., Iliadou P., Agianniotaki E.I., Robardet E., Liandris E., Doudounakis S., Tzani M., Tsaroucha P., Picard-Meyer E., Cliquet F., Mangana-Vougiouka O. Recurrence of animal rabies, Greece, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(2):327-329. DOI 10.3201/eid2002.130473
- Teacher A.G., Thomas J.A., Barnes I. Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and differing responses within the carnivores to historical climatic change. *BMC Evol. Biol.* 2011;11:214. DOI 10.1186/1471-2148-11-214
- Valvo G. Applications of Landscape Genetics for Wildlife Conservation and Management. Doctoral thesis. Univ. of Padua, Department of Animal Sciences, 2011
- Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 1984;38:1358-1370
- Zecchin B., De Nardi M., Nouvellet P., Vernesi C., Babbucci M., Crestanello B., Bago Z., Bedeković T., Hostnik P., Milani A., Donnelly C.A., Bergelloni L., Lorenzetto M., Cattoli G. Genetic and spatial characterization of the red fox (*Vulpes vulpes*) population in the area stretching between the Eastern and Dinaric Alps and its relationship with rabies and canine distemper dynamics. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213515. DOI 10.1371/journal.pone.0213515

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

Received July 8, 2024. Revised August 19, 2024. Accepted August 27, 2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-84

Detailed cytogenetic analysis of three duck species (the northern pintail, mallard, and common goldeneye) and karyotype evolution in the family Anatidae (Anseriformes, Aves)

V.R. Beklemisheva , K.V. Tishakova , S.A. Romanenko , D.A. Andreyushkova¹, V.A. Yudkin ^{2, 3}, E.A. Interesova ^{2, 4}, F. Yang ⁵, M.A. Ferguson-Smith ⁶, A.S. Graphodatsky ¹, A.A. Proskuryakova ¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁵ School of Life Sciences and Medicine, Shandong University of Technology, Zibo, China

⁶ Cambridge Resource Center for Comparative Genomics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

 bekl@mcb.nsc.ru

Abstract. Galliformes and Anseriformes are two branches of the Galloanserae group, basal to other Neognathae. In contrast to Galliformes, Anseriformes have not been thoroughly researched by cytogenetic methods. This report is focused on representatives of Anseriformes and the evolution of their chromosome sets. Detailed cytogenetic analysis (G-banding, C-banding, and fluorescence *in situ* hybridization) was performed on three duck species: the northern pintail (*Anas acuta*, $2n = 80$), the mallard (*A. platyrhynchos*, $2n = 80$), and the common goldeneye (*Bucephala clangula*, $2n = 80$). Using stone curlew (*Burhinus oedicnemus*, $2n = 42$, Charadriiformes) chromosome painting probes, we created homology maps covering macrochromosomes and some microchromosomes. The results indicated a high level of syntenic group conservation among the duck genomes. The two *Anas* species share their macrochromosome number, whereas in *B. clangula*, this number is increased due to fissions of two ancestral elements. Additionally, in this species, the presence of massive heterochromatic blocks in most macroautosomes and sex chromosomes was discovered. Localization of clusters of ribosomal DNA and telomere repeats revealed that the duck karyotypes contain some microchromosomes that bear ribosomal RNA genes and/or are enriched for telomere repeats and constitutive heterochromatin. Dot plot (D-GENIES) analysis confirmed the established view about the high level of syntenic group conservation among Anatidae genomes. The new data about the three Anatidae species add knowledge about the transformation of macro- and sex chromosomes of Anseriformes during evolution.

Key words: *Anas acuta*; *Anas platyrhynchos*; *Bucephala clangula*; *Burhinus oedicnemus*; comparative chromosome painting; constitutive heterochromatin; ribosomal genes; telomere.

For citation: Beklemisheva V.R., Tishakova K.V., Romanenko S.A., Andreyushkova D.A., Yudkin V.A., Interesova E.A., Yang F., Ferguson-Smith M.A., Graphodatsky A.S., Proskuryakova A.A. Detailed cytogenetic analysis of three duck species (the northern pintail, mallard, and common goldeneye) and karyotype evolution in the family Anatidae (Anseriformes, Aves). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(7):759-769. DOI 10.18699/vjgb-24-84

Funding. This research was supported by Russian Science Foundation grant No. 23-74-01016 (to P.A.A.).

Acknowledgements. The authors express their gratitude to Ju. Butakova (Laboratory of Animal Cytogenetics, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russia) for her comprehensive assistance, D.V. Yudkin for helping to obtain the tissue samples, and V.T. Volobuev for establishing the stone curlew cell line. The authors gratefully acknowledge the resources provided by the Molecular and Cellular Biology core facility at the IMCB SB RAS. The English language was corrected and certified by shevchuk-editing.com. We thank two anonymous reviewers for their insightful comments and suggestions.

Комплексный цитогенетический анализ кариотипов трех видов уток (шилохвость, кряква и обыкновенный гоголь) и эволюция кариотипов у представителей семейства Anatidae (Anseriformes, Aves)

В.Р. Беклемишева , К.В. ТишакOVA , С.А. Романенко , Д.А. Андреюшкова¹, В.А. Юдкин ^{2, 3}, Е.А. Интересова ^{2, 4}, Ф. Янг ⁵, М.А. Фергюсон-Смит ⁶, А.С. Графодатский ¹, А.А. Проскурякова ¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

© Beklemisheva V.R., Tishakova K.V., Romanenko S.A., Andreyushkova D.A., Yudkin V.A., Interesova E.A., Yang F., Ferguson-Smith M.A., Graphodatsky A.S., Proskuryakova A.A., 2024

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

⁴ Томский государственный университет, Томск, Россия

⁵ Школа медицины и наук о жизни, Шандонский технологический университет, Цзыбо, Китай

⁶ Кембриджский ресурсный центр сравнительной геномики, Кембриджский университет, Кембридж, Великобритания

✉ bekl@mcb.nsc.ru

Аннотация. Курообразные (Galliformes) и гусеобразные (Anseriformes) – две ветви группы Galloanserae, базальные по отношению к остальным Neognathae. В сравнении с Galliformes, эволюция кариотипов Anseriformes недостаточно изучена. Настоящее исследование посвящено представителям гусеобразных и изменению их хромосомных наборов в ходе эволюции. Была получена подробная информация о кариотипах (G-, C-бэндинг, флуоресцентная гибридизация *in situ*) трех видов уток: шилохвости (*Anas acuta*, $2n = 80$), кряквы (*Anas platyrhynchos*, $2n = 80$) и обыкновенного гоголя (*Bucephala clangula*, $2n = 80$). С использованием зондов, разработанных на основе сортированных хромосом авдотки (*Burhinus oedicnemus*, $2n = 42$, Charadriiformes), были выявлены районы гомологии на макрохромосомах и части микрохромосом уток. Изученные виды рода *Anas* имеют одинаковое число макрохромосом, при этом у *B. clangula* число крупных хромосом увеличено за счет двух разрывов предковых элементов. В отличие от представителей *Anas*, у этого вида обнаружены массивные гетерохроматиновые блоки в большинстве крупных макроаутосом и в половых хромосомах. Данные хромосомного пэинтинга дополнены информацией о локализации рибосомной ДНК и амплификации теломерных повторов. Сравнительный анализ геномов с помощью приложения D-GENIES подтвердил высокий уровень консерватизма синтенных групп у Anatidae. Полученные результаты расширили представление о преобразованиях макро- и половых хромосом Anseriformes в ходе эволюции.

Ключевые слова: *Anas acuta*; *Anas platyrhynchos*; *Bucephala clangula*; *Burhinus oedicnemus*; сравнительный хромосомный пэинтинг; конститутивный гетерохроматин; рибосомные гены; теломера.

Introduction

Aves is one of the most specialized and species-rich groups of amniotes. Avian genomes are characterized by a relatively small size (1.4 Gb on average) (Gregory, 2023), a high degree of conserved synteny, and a relatively small proportion of repetitive DNA (Delany et al., 2000; Ellegren, 2013; Campagna, Toews, 2022). Birds' diploid chromosome number ($2n$) varies from 40 to 142 owing to the presence of numerous microchromosomes (Christidis, 1990; Griffin et al., 2007; Degrandi et al., 2020). Despite the growing popularity of birds as a genomic research object, many species remain understudied both at the genomic and cytogenetic level. According to the Bird Chromosome Database, only 10 % of the species have a described karyotype, and comparative genomic studies have covered no more than 1 % of the species (Degrandi et al., 2020).

The order Anseriformes (geese, ducks, swans, and others) includes ~180 species (Gill et al., 2023) and together with Galliformes (chickens, guinea fowl, pheasants, and others) forms the Galloanserae clade. Galloanserae taxon diverged from other Neognathae approximately 100–70 million years ago (Van Tuinen, Hedges, 2001; Sun et al., 2017). Karyotypes of 46 Anseriformes species have been described. The diploid number of chromosomes varies from $2n = 74$ (*Spatula querquedula*) (Ebied et al., 2005) to $2n = 98$ (*Coscoroba coscoroba*) (Rodrigues et al., 2014). Nonetheless, most karyotypes contain $2n = 80$ –82 (Bird Chromosome Database and (Degrandi et al., 2020)).

Eight Anseriformes species have been studied by comparative chromosome painting using chicken macrochromosome probes (Degrandi et al., 2020). The chicken (*Gallus gallus*, GGA, $2n = 78$) genome is widely used as a reference in comparative genomics, and the painting probes have become essential for avian comparative cytogenetic researches (Shetty et al., 1999; Guttenbach et al., 2003; Griffin et al., 2008; Nanda et al., 2011; Islam et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Uno et al., 2019). Based on comparative data obtained using chicken painting probes, a hypothesis about homology of the first 10 macrochromosomes and Z chromosome in the avian

ancestral karyotype has been propounded (Shibusawa et al., 2004; Griffin et al., 2007). Integration of microchromosomes into comparative cytogenetics can be implemented using microdissection (Zimmer et al., 1997; Griffin et al., 1999; Guillier-Gencik et al., 1999; Grützner et al., 2001; Masabanda et al., 2004), gene-specific probes (Coullin et al., 2005; Islam et al., 2014), and bacterial artificial chromosomes (BACs) (Shibusawa et al., 2001, 2002; Schmid et al., 2005; Fillon et al., 2007; Damas et al., 2017; Kretschmer et al., 2021). The set of avian probes obtained using chromosome sorting usually does not cover microchromosomes (Habermann et al., 2001).

The use of stone curlew (*Burhinus oedicnemus*; BOE) painting probes helps to include microchromosomes into cytogenetic analysis and to count linkage groups. The stone curlew has a karyotype with a diploid number $2n = 42$ and contains only four pairs of microchromosomes (Bulatova et al., 1971). BOE painting probes have been applied to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments on a wide range of avian karyotypes, including reciprocal chromosome painting between the stone curlew and chicken (Hansmann et al., 2009; Nie et al., 2009, 2015; Wang et al., 2022). On the other hand, this type of analysis has not fully resolved the correspondence between microchromosomes (Nie et al., 2009). These data obtained using cytogenetic approaches and chromosome level genome assembly allow for the inclusion of microchromosomes into reconstructions of the avian ancestral karyotype (Damas et al., 2018).

There are several papers on Anseriformes chromosome evolution. In general, bird karyotypes have a low level of interchromosomal rearrangements (Griffin et al., 2008; Damas et al., 2018) and at the same time a high average rate of intra-chromosomal rearrangements (Damas et al., 2019; O'Connor et al., 2024). Chicken BAC probes mapped onto *Anas platyrhynchos* chromosomes have revealed the presence of inversions in all macrochromosomes and in the Z chromosome of the duck relative to the chicken (Fillon et al., 2007; Kiazim et al., 2021). However, conservation of gene order among several Anseriformes species has been detected by means of gene-

specific probes (Islam et al., 2014). Data on chromosome homology and rearrangements can be obtained by chromosome-level assembly analysis (for example (Cabanettes, Klopp, 2018)). Now chromosome-level genome assemblies are available for 26 Anseriformes species in the NCBI database.

In the present work, we analyzed karyotype evolution of Anseriformes species by combining new data and previously published ones. New comprehensive cytogenetic results were obtained for three Anatidae species: the mallard (*A. platyrhynchos*, APL), the northern pintail (*Anas acuta*, AAC), and the common goldeneye (*Bucephala clangula*, BCL). Routine and differential staining (G- and C-banding) and molecular cytogenetic approaches (localization of ribosomal and telomeric painting probes and of the set of *B. oediacnemus* whole-chromosome painting probes) were employed, and the results were integrated with previously obtained findings.

Materials and methods

Sampled species and an ethical statement. Lung necropsy was performed on females of *A. platyrhynchos*, *A. acuta*, and *B. clangula* during the official hunting season in Novosibirsk Oblast (2009, 2008, 2023 years, respectively). For our research, we used one individual of each species. All experiments were approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research at the Institute of Molecular and Cellular Biology (IMCB), the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SB RAS), Russia (decision No. 1/22 of 29 December 2022), following all relevant guidelines and regulations. This article does not contain any experiments on human subjects by the authors. The study was completed using equipment and materials of large-scale research facilities of the Cryobank of Cell Cultures, IMCB, SB RAS (Novosibirsk, Russia).

Primary fibroblast culture, metaphase chromosome preparation, and chromosome staining. Primary cell cultures were derived from lung necropsy as described previously (Romanenko et al., 2015). Metaphase spreads from all species were prepared from primary fibroblast cultures following standard procedures, including colcemid treatment, incubation in a hypotonic solution, and fixation in a methanol:acetic acid (3:1) mixture (Graphodatsky et al., 2001).

Routine Giemsa and/or DAPI staining was performed to identify morphology and count quantity of chromosomes. G-banding was done (Seabright, 1971) before FISH procedures. C-banding was performed for *B. clangula* and *A. acuta* according to a standard protocol (Sumner, 1972). Besides, for *B. clangula*, C-banding was done with modifications: metaphase chromosomes after Ba(OH)₂ treatments were stained overnight with Chromomycin A3 (20 µg/ml) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 50 ng/ml) and mounted in an antifade solution containing 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO) (20 mg/ml) and 100 mM Tris-HCl pH 7.5 in glycerol.

Probe preparation, FISH, and microscopy. A set of whole-chromosome female DNA libraries (created from flow-sorted chromosomes by degenerate-oligonucleotide-primed (DOP)-PCR (Telenius et al., 1992)) of the stone curlew was provided by Cambridge Resource Center for Comparative Genomics (Cambridge University, UK). The characterization of the set was described previously (Nie et al., 2009).

All DNA libraries were labeled with biotin-11-dUTP and digoxigenin-11-dUTP (Sigma-Aldrich, Germany) during secondary DOP-PCR amplification (Telenius et al., 1992) to create painting probes. A telomeric DNA probe was generated by PCR with oligonucleotides (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅ (Ijdo et al., 1991). A ribosomal DNA probe was obtained from plasmid DNA (pHr13) containing a human partial 18S ribosomal RNA (rRNA) gene, a full human 5.8S rRNA gene, a partial 28S rRNA gene, and two internal spacers (Maden et al., 1987). Labeling was performed using the FTP-Display DNA Fragmentation Kit (DNA-Display, Russia) with the addition of 0.05 mM biotin-11-dUTP or digoxigenin-11-dUTP (Sigma).

FISH was carried out by standard protocols (Graphodatsky et al., 2000; Liehr et al., 2017). For suppression of non-specific hybridization of probes in FISH experiments, chicken C₀t10 DNA was used. Digoxigenin-labeled probes were detected with the help of anti-digoxigenin-CyTM3 (Jackson ImmunoResearch, United Kingdom), whereas biotin-labeled probes were identified via sequential use of avidin-FITC (Vector Laboratories, USA) and anti-avidin FITC (Vector Laboratories). Images were captured and processed using a VideoTesT 2.0 Image Analysis System and a Baumer Optronics CCD Camera mounted on an Olympus BX53 microscope (Olympus, Japan).

Bioinformatic analysis. To perform the analysis of chromosome-level assemblies, we used the available material from GenBank NCBI. Chromosome-level assemblies of different Anseriformes species from different genera were compared with the *A. platyrhynchos* reference genome

(GCA_008746955.3; 1n = 40, Z, W);

A. acuta (GCA_963932015.1; 1n = 37, Z, W);

Aythya baeri (GCA_026413565.1; 1n = 34, Z);

Netta rufina (GCA_964035555.1; 1n = 40, Z, W);

Cairina moschata (GCA_018104995.1, 29, Z);

Clangula hyemalis (GCA_963989345.1; 1n = 40, Z);

Anser cygnoides (GCA_026259575.1; 1n = 39);

Cygnus olor (GCF_009769625.2; 1n = 34, Z, W);

Oxyura jamaicensis (GCF_011077185.1; 1n = 33, Z, W).

Dot plot comparative analysis was performed using the web application D-GENIES (Cabanettes, Klopp, 2018) by aligner Minimap2 v2.24.

Results

Karyotypes of the three duck species

Karyotypes of the three duck species were available: *A. platyrhynchos* (APL), *A. acuta* (AAC), and *B. clangula* (BCL) (Takagi, Makino, 1966; Beçak et al., 1973; Islam et al., 2014). The diploid chromosome number of all three species is 2n = 80. For each individual of the studied duck species, we counted the number of chromosomes in 30 routine stained metaphase plates. The *A. platyrhynchos* (mallard) karyotype was G-, R-, and C-banded before (Wójcik, Smalec, 2007) and the patterns coincided with our study.

Cytogenetic data on *A. acuta* and *B. clangula* have been limited to Giemsa-stained karyotypes (Beçak et al., 1973; Abu-Almaaty et al., 2019). We performed Giemsa staining and C-banding for individuals of both species. The *A. acuta* karyotype was found to contain five pairs of large macro-autosomes (submetacentric pairs 1 and 2, and acrocentric pairs 3–5). The Z chromosome is a medium-sized subtelocen-

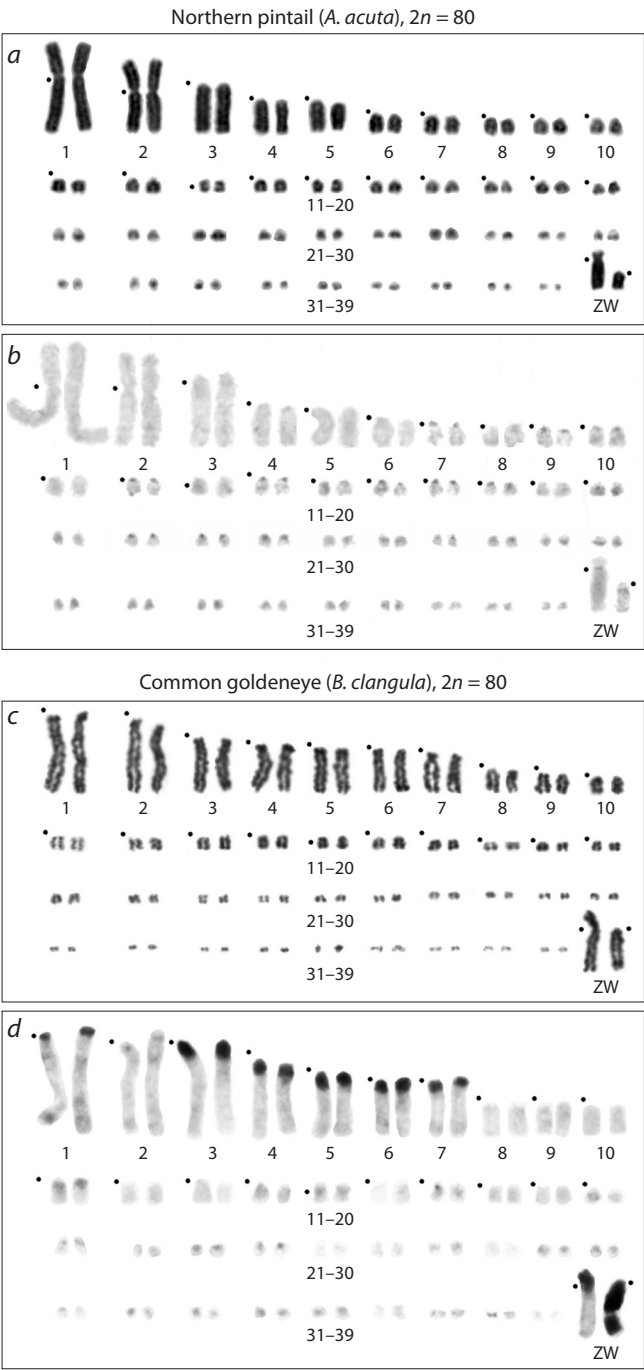


Fig. 1. Routinely Giemsa-stained chromosomes of (a) *A. acuta* and (c) *B. clangula* and C-banded karyotypes of (b) *A. acuta* and (d) *B. clangula*. Each black dot indicates a centromere position.

tric macrochromosome, and the W chromosome is a small acrocentric chromosome (Fig. 1a). C-heterochromatin proved to be dot-like blocks in centromeric regions of almost all chromosomes except for large macroautosomes 1–5 and some microchromosomes (Fig. 1b). In the W chromosome, a pericentromeric heterochromatic block was observed. *B. clangula* large macrochromosomes 1–7 and the W chromosome are acrocentric, whereas the Z chromosome is subtelocentric (Fig. 1c). Constitutive heterochromatin in this species was found to be localized in pericentromeric regions

of the six macroautosomes and the Z chromosome. In addition, the W chromosome is almost entirely heterochromatic (Fig. 1d). Overall, the *B. clangula* karyotype, as compared to the two *Anas* karyotypes, is enriched with repeated DNA organized in constitutive heterochromatin.

Localization of ribosomal genes and telomere repeats

Sequences carrying ribosomal genes and clusters of repeats homologous to rDNA were located on four small microchromosome pairs in *A. acuta* and *A. platyrhynchos* (Islam et al., 2014) and on two pairs in *B. clangula* (Supplementary Material 1)¹.

In the *A. acuta* and *B. clangula* karyotypes, the probe containing (5'-TTAGGG-3')_n sequences detected small signals at the ends of all chromosomes except four or five pairs of dot-like microchromosomes with prominent signals. Besides, *A. acuta* was found to have a pair of microchromosomes where half of each chromosome was stained with a telomeric probe, and the other half contained a bright DAPI-positive region (AT rich) (Fig. 3 and Supplementary Material 1). We could not detect interstitial telomeric sites in macrochromosomes of the analyzed species.

Stone curlew homologies

The complete set of BOE painting probes was hybridized to chromosomes of *A. acuta*, *A. platyrhynchos*, and *B. clangula* (Fig. 2). Owing to G-banding prior to FISH experiments, painted macrochromosomes were easily identified. We obtained specific signals on macrochromosomes and some microchromosomes of the three species. The probe containing the W chromosome also hybridized with Z: in *A. acuta* and *A. platyrhynchos*, weak signals along the chromosome body were detected; in *B. clangula*, a bright signal was detected in the subtelomere region of the q arm (Fig. 3). Also, the W chromosome signals on the *B. clangula* W chromosome covered subtelomere C-positive block. Other heterochromatic regions were not hybridized with BOE painting probes on *B. clangula* chromosomes. Signals on some microchromosomes were so weak that we failed to identify them. Quantities of microchromosomes covered by signals are presented in Table. Examples of some FISH results are shown in Fig. 2.

Based on these results, comparative chromosome maps were created showing the homology between BOE and the three Anatidae species (see the Table, Fig. 3). Identification of many microchromosomes was limited by the resolution of the FISH method. Nonetheless, these maps gave an idea of relative sizes of labeled microchromosomes within size groups (pairs 11–20, 21–30, or 31–39). In total, homologies were identified for 66 out of 80 chromosomes of *A. acuta*, 68 out of 80 *A. platyrhynchos* chromosomes, and 76 out of 80 *B. clangula* chromosomes because each species has a different number of painted microchromosomes.

Discussion

Microchromosomes are typical of most amniotes (snakes, turtles, and lizards) with mammals and crocodilians being exceptions (Srikulnath et al., 2021; O'Connor et al., 2024). The presence of microchromosomes in avian karyotypes may

¹ Supplementary Materials 1–3 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx26.pdf>

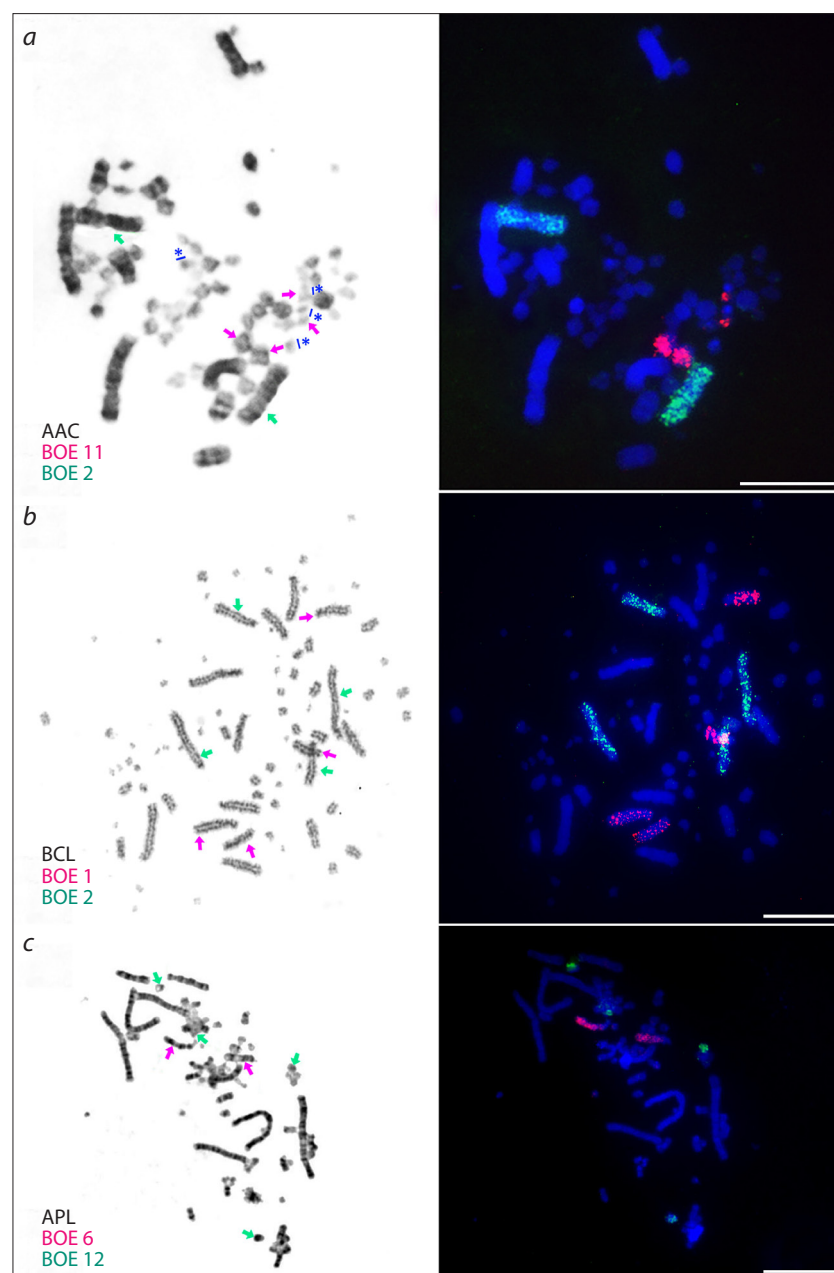


Fig. 2. Examples of *B. oedicnemus* (BOE) painting probes' localization on karyotypes of Anatidae representatives (right) with GTG-banding of the same metaphase (left).

a – hybridization of BOE 11 (red) and 2 (green) probes to *A. acuta* (AAC) chromosomes; b – hybridization of BOE 1 (red) and 2 (green) to *A. platyrhynchos* mallard (APL) chromosomes; c – hybridization of BOE 6 (red) and 12 (green) probes to *B. clangula* (BCL) chromosomes. Blue marks and * indicate microchromosomes carrying a large DAPI-positive heterochromatic region in *A. acuta*. Scale bars 10 µm.

account for the lag of bird cytogenetic studies behind mammalian studies. To date, 131 bird species from 47 families have been analyzed by comparative chromosome painting, i. e., no more than 2 % of extant avian species (Degrandi et al., 2020) (<https://sites.unipampa.edu.br/birdchromosomedatabase>).

The studied karyotypes of ducks from genera *Anas* and *Bucephala* possess identical diploid chromosome numbers ($2n = 80$). The diploid chromosome number reported for *A. acuta* varies among publications from 80 (Abu-Almaaty et al., 2019) to 82 (Beçak et al., 1973). A similar situation is true for *B. clangula*: diploid chromosome number $2n = 80$ was shown for *B. clangula americana* (Beçak et al., 1973) and $2n = 84$ for *B. clangula* (Hammar, 1970).

Our results match the data obtained by A.H. Abu-Almaaty with co-authors and M.L. Beçak with co-authors, respectively: diploid chromosome number is $2n = 80$ for both *A. acuta* and *B. clangula* (Fig. 1).

Previously it was reported that, even at the macrochromosomal level, chromosome banding can be difficult to identify, thereby making necessary a robust analysis of cross-species homology (O'Connor et al., 2024). In this work we provided information about G-banding for three Anatidae species. This allowed reliable identification of all macro- and some microchromosome pairs. We used chromosome painting to gain a better understanding of the transformations that have caused the karyotype differences. Previously, comparative chromosome painting in Anatidae species has been performed only with chicken macrochromosome probes (Guttenbach et al., 2003; Nanda et al., 2011; Islam et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Uno et al., 2019), but Anseriformes karyotypes have not been investigated using BOE painting probes. Applying the set of BOE painting probes, we revealed homologies between *B. oedicnemus*, *A. acuta*, *A. platyrhynchos*, and *B. clangula* chromosomes. According to previously published findings (Nie et al., 2009), we added homologies of *Gallus gallus* (GGA) to our comparative analysis (see the Table).

Due to availability of chromosome-level genome assemblies of *A. platyrhynchos* and *A. acuta*, we prepared a dot plot analysis for genomes of Anseriformes species from different genera (Supplementary Material 3). *A. platyrhynchos* is a domestic species and its genome has been studied in detail and is usually used as the reference for this taxon. We made pairwise comparative analysis with *A. platyrhynchos* and eight genomes: *A. acuta*, *Aythya baeri*, *Netta rufina*, *Cairina moschata*, *Clangula hyemalis*, *Anser cygnoides*, *Cygnus olor*, and *Oxyura jamaicensis*. Karyotypes of most compared species contain 80 chromosomes, except for *A. cygnoides* and *N. rufina* ($2n = 82$) (Degrandi et al., 2020). The karyotype of *C. hyemalis* was not described. In almost all assemblies, the number of chromosome scaffolds is lower than haploid chromosome number and does not cover the smallest microchromosomes. The homologies between *A. platyrhynchos* and *A. acuta*, identified using chromosome painting and dot plot analysis are consistent with each other (Supplementary Material 3a). The chromosome correspondence can also be traced at the G-banding level.

Macroautosome evolution in Anseriformes

The most notable difference in macrochromosome structure among the three species is the presence of massive heterochromatic blocks in *B. clangula* macrochromosomes 1 and 3–7 (Fig. 1d). FISH with the stone curlew painting probes and dot plot analysis revealed conserved macrochromosome homologies between *A. acuta* and *A. platyrhynchos*. The diploid number ($2n = 80$) is typical for most Anatidae species, but in the *B. clangula* karyotype, we found an increase in the number of large chromosomes without a change in the diploid chromosome number. The reason is fission of ancestral chromosomes corresponding to GGA 1 and GGA 2 (Fig. 3, 4). A break in the centromere of ancestral chromosomes homologous to GGA 2 has been documented in other representatives of Galloanseres, for example, in the turkey (Shibusawa et al., 2004). In other avian lineages, there are independent fissions of orthologs of GGA 2 around the centromere (Degrandi et al., 2020). The ancestral homolog of GGA chromosome 1 was split in two within Passeriformes' ancestral karyotype (Damas et al., 2018).

Orthologous elements of GGA 4 are represented by one macrochromosome and one microchromosome in the three examined ducks (see the Table). By contrast, the GGA 4 probe hybridized to one macrochromosome in *Anser anser* (Fig. 4) (Guttenbach et al., 2003). Ancestral chromosome 4 (corresponding to GGA 4q) is the most ancient of all the avian chromosomes, appearing intact even in humans (Chowdhary, Raudsepp, 2000). In the GGA genome, we can see the result of fusion of avian ancestral chromosomes 4 and 10 (4A) (GGA 4q and 4p) (Shibusawa et al., 2002; Guttenbach et al., 2003; Derjusheva et al., 2004; Itoh, Arnold, 2005; Griffin et al., 2007; Damas et al., 2018), and 4p still retains properties of a microchromosome (high gene density and recombination rate, CpG island distribution). The observed interchromosomal changes have also taken place in different lineages (Fig. 4) and led to genome reorganization in the extant species. These observations may be best explained by rearrangements with common breakpoint reuse.

The data of dot plot analysis also identified the presence of interchromosomal rearrangements affecting macrochromosomes in *C. moschata* and *O. jamaicensis* (Supplementary Material 3d, h). In *C. moschata*, fission of chromosomes orthologous to

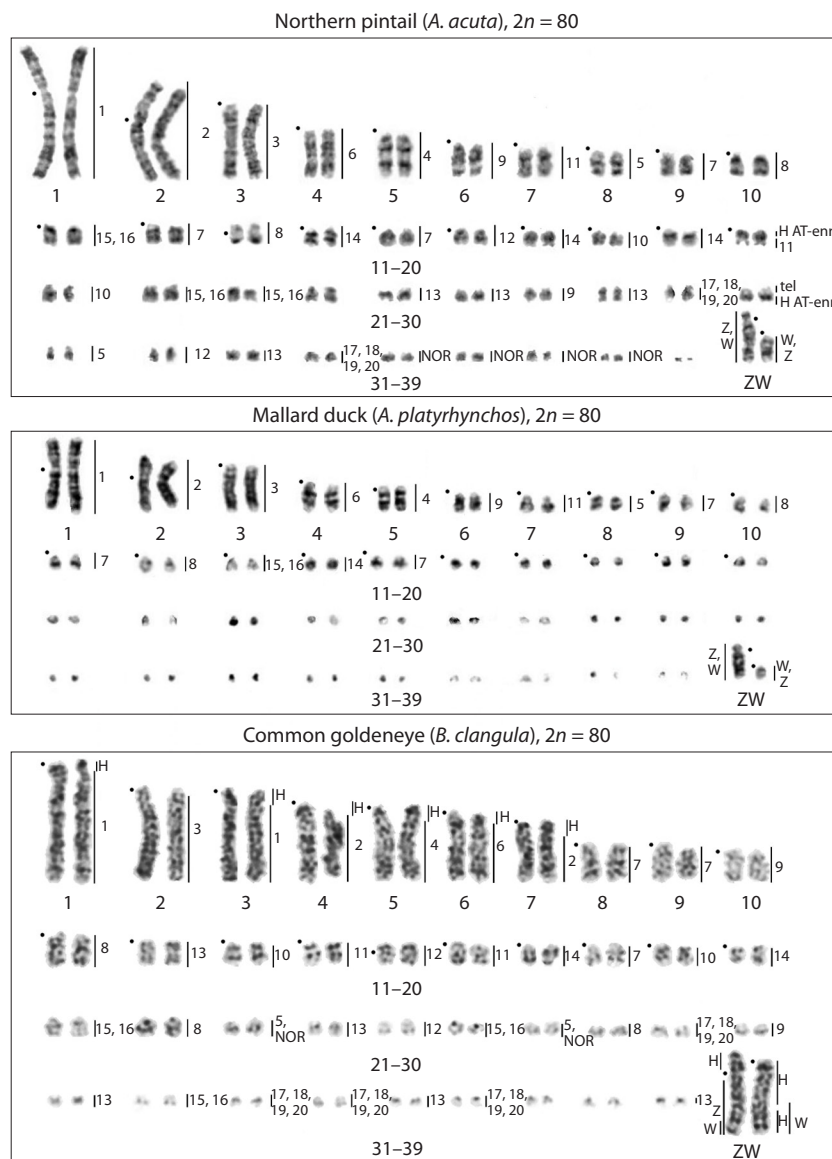


Fig. 3. G-banded karyotypes of *A. acuta*, *A. platyrhynchos*, and *B. clangula* with assignment of homologies to *B. oedicnemus* chromosomes.

Numbers on the right indicate names of homologous stone curlew chromosomes; H – blocks of heterochromatin; NOR – positions of ribosomal DNA clusters; black circles indicate centromere positions; tel – a cluster of telomeric repeated sequences on a microchromosome containing a large DAPI-positive heterochromatic region in *A. acuta*.

A. platyrhynchos 6 and 7 and fusion parts of these chromosomes with chromosomes 5 and 8 respectively are observed (Supplementary Material 3d). Identified rearrangements are not confirmed using chromosome painting (Islam et al., 2014). This may be due to either a weak signal that would not be detected by chicken chromosome painting probes, or an artifact of *de novo* genome assembly. Also, in *O. jamaicensis*, genome fusion of chromosomes orthologous to *A. platyrhynchos* 4 and 11 was detected (Supplementary Material 3h). Minor interchromosomal rearrangements in pericentromeric regions of almost all macrochromosomes were observed.

Evolution of microchromosomes in Anseriformes

Bird microchromosomes have attracted research attention because although for most bird species these chromosomes represent 25 % of the genome, they are known to encode 50 % of all genes (Smith et al., 2000). It has been hypo-

Chromosome correspondence between *B. oedicnemus* (BOE) and four Galloanseres species obtained using chromosome painting:
G. gallus (GGA), *A. acuta* (AAC), *A. platyrhynchos* (APL), and *B. clangula* (BCL)

BOE, 2n = 42	GGA, 2n = 78	AAC, 2n = 80	APL, 2n = 80	BCL, 2n = 80
Chr1	Chr1	Chr1	Chr1	Chr1, Chr7
Chr2	Chr2	Chr2	Chr2	Chr3, Chr4
Chr3	Chr3	Chr3	Chr3	Chr2
Chr4	Chr4q	Chr5	Chr5	Chr5
Chr5	Chr7, Chr8	Chr8 + 1 MIC	Chr8 + 1 MIC	2 MICs
Chr6	Chr5	Chr4	Chr4	Chr6
Chr7	Chr9 + 2 MICs	3 MICs	3 MICs	Chr8, Chr9 + 1 MIC
Chr8	Chr4p + 1 MIC	2 MICs	3 MICs	3 MICs
Chr9	Chr6 + 1 MIC	Chr6 + 1 MIC	Chr6 + 1 MIC	Chr10 + 1 MIC
Chr10	2 MICs	2 MICs	2 MICs	2 MICs
Chr11	2 MICs	Chr7 + 1 MIC	Chr7 + 1 MIC	2 MICs
Chr12	2 MICs	2 MICs	2 MICs	2 MICs
Chr13	2 MICs	4 MICs	4 MICs	5 MICs
Chr14	2 MICs	2 MICs	1 MIC	2 MICs
Chr15+16	3 MICs	3 MICs	2–3 MICs	3 MICs
Chr17+18+19+20	1 MIC	2 MICs	4 MICs	4 MICs
Z	Z	Z, W	Z, W	Z
W	W, Zqdist	W	W	W, Zqdist
TOT	56	66	68	76

Data on homology between GGA and BOE chromosomes are from W. Nie et al. (2009). MICs are quantities of microchromosome pairs; Chr – the chromosome; TOT – the total quantities of chromosomes labeled by BOE painting probes; dist – the distal part of the chromosome.

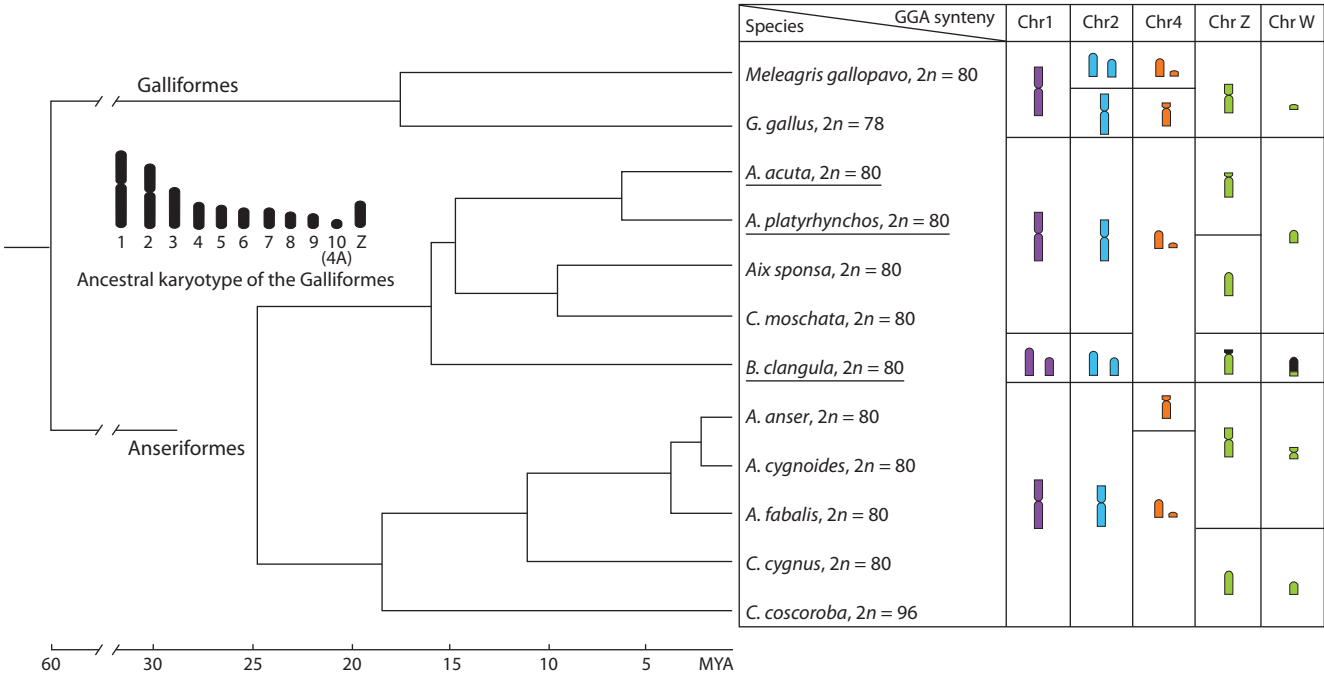


Fig. 4. Schematic representation of chromosome rearrangements that occurred in macro- and sex chromosomes during the evolution of Galloanseres according to molecular phylogenies (Prum et al., 2015; Sun et al., 2017).
Rearrangements of chromosomes that were identified by comparative painting with chicken probes (Guttenbach et al., 2003; Nanda et al., 2011; Islam et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Uno et al., 2019) or stone curlew probes (data obtained in this study, species names are underlined) are presented to the right of the molecular phylogeny. The ancestral karyotype of Galliformes and data about Galliformes species are from M. Shibusawa et al. (2004); D.K. Griffin et al. (2007); J. Damas et al. (2019).

thesized that avian microchromosomes represent archaic linkage groups of ancestral vertebrates and have been preserved in a conserved state throughout the evolution of birds (Burt, 2002; Nakatani et al., 2007). Among Anatidae species, only *A. platyrhynchos* microchromosomes have been examined by FISH with chicken BAC probes, and the obtained data have confirmed the idea of high conservatism of avian genomes (Fillon et al., 2007; Kiazim et al., 2021).

The set of BOE painting probes covered not all duck microchromosomes (see the Table, Fig. 3). Enrichment of some microchromosomes with ribosomal DNA sequences and telomeric repeats may also influence the detection of homologous sequences on microchromosomes. Sizes of homologous segments on microchromosomes may be below the resolution level of molecular cytogenetics. This problem may be exemplified by BOE 5 and orthologous elements in chicken and duck karyotypes. This probe delineated GGA 7 and GGA 8 but only two pairs of small microchromosomes in *B. clangula*. Most likely, BOE 5 labels more microchromosomes in ducks, and some signals were overlooked when the FISH data were inspected.

Although all three ducks examined here have the same diploid number, in the *B. clangula* chromosomal set, we suggest there are at least two ancestral macrochromosome fissions. It is possible that some microchromosomes have merged or fused with macrochromosomes during the formation of the *B. clangula* karyotype. For Galloanserae, interchromosomal rearrangements between microchromosomes have not yet been recorded, but for other orders of Neognathae, data on interchromosomal rearrangements involving macro- and microchromosomes and the fusion of microchromosomes are gradually accumulating (reviewed in (O'Connor et al., 2024)). In addition, many researchers believe that the ancestral element 10 (4A) is a microchromosome according to its GC content and gene density (Griffin et al., 2007; Damas et al., 2018; O'Connor et al., 2024). Fusion of ancestral elements 10 (4A) with 4 is often observed in Anseriformes (Fig. 4).

Another example of the fusion of micro- and macrochromosomes was revealed by dot plot analysis in Galloanserae species *O. jamaicensis* (Supplementary Material 3h). Fusions of microchromosomes occurred in birds; for example, numerous fusions of microchromosomes took place during formation of the stone curlew karyotype (Nie et al., 2009). The fusion of microchromosomes was revealed in the genome of *C. moschata* (Supplementary Material 3d). The use of BAC clones to analyze the chromosome set of *B. clangula* and chromosome-level genome assembly will help to identify rearrangements that occurred during the formation of the karyotype of this species.

Given the low number of repeated sequences in bird genomes, the large number of telomeric sequences (2 to 4 %) is a point of interest (Delany et al., 2000). In addition to the canonical localization of (5'-TTAGGG-3')_n sequences at the ends of chromosomes, these highly conserved sequences may be situated at an interstitial position: around a centromere or inside a chromosome arm. Three types of telomere arrays differing in length, position on a chromosome, age-related stability, and linked either to macro- or to microchromosomes have been described in the chicken (Delany et al., 2000,

2007; Rodrigue et al., 2005). It has been demonstrated that some avian microchromosomes tend to accumulate telomeric repeats. So-called mega-telomeres (200 kbp to 3 Mbp) at one of the ends have been detected in three chicken chromosomes from highly inbred White Leghorn line (9 and 2 microchromosomes) (Rodrigue et al., 2005; Delany et al., 2007).

Similar features of the distribution and amplification of telomeric sequences have been described for representatives of Passeriformes (Dos Santos et al., 2015, 2017) and three anserid species (Islam et al., 2014). In the *C. moschata* karyotype, 14 pairs of microchromosomes bear extended telomeres (Nanda et al., 2002). We also located extended telomeric sequences at the ends of four microchromosome pairs in *B. clangula* and 4–5 dot-like microchromosome pairs in *A. acuta* (Supplementary Material 1). Further studies involving larger number of individuals, mapping BAC probes to identify individual chromosomes, are needed to determine whether microchromosomes with large clusters of telomeric repeats are common to all Galloanserae, or whether different microchromosomes tend to accumulate telomeric sequences in different bird species.

Genes of 18S–28S rDNA are believed to have been located on a single pair of microchromosomes in the ancestral avian karyotype, as observed in palaeognathous birds and in the chicken (Nishida-Umehara et al., 2007; Delany et al., 2009). We found clusters of rRNA genes on four microchromosome pairs in *A. acuta* and two pairs in *B. clangula*. Localization of rDNA sequences on several pairs of microchromosomes was also described for *A. platyrhynchos*, *C. moschata*, and *Anser cygnoides* (Islam et al., 2014).

Some bird microchromosomes have accumulated different types of repeated sequences during karyotype evolution (Nanda et al., 2002; Dos Santos et al., 2015, 2017; Zlotina et al., 2019; de Oliveira A.M. et al., 2024). We revealed the presence of microchromosomes enriched with telomeric sequences and/or constitutive heterochromatin in *A. acuta* (Fig. 3 and Supplementary Material 1). The data presented here are based on the analysis of one individual from each investigated species. Perhaps accumulation of repetitive sequences is subject to intraspecific variation, and we need more information to address this issue.

Sex chromosome evolution

There is variation in morphology of Z chromosomes of Galloanserae in terms of centromere position and size of heterochromatin regions (Fig. 3). For example, it was reported previously that the centromere position on the Z chromosome is different between the chicken and turkey, but most likely this situation is a consequence of the accumulation of heterochromatin on the chicken Z chromosome (Shibusawa et al., 2004). In Anseriformes, submetacentric, subtelocentric, and acrocentric Z chromosomes were observed (Fig. 4). Recent research indicates that the bird Z chromosome is involved in inter- and intrachromosomal rearrangements (Damas et al., 2019). Dot plot analysis of eight Anseriformes species identified the same gene order on the Z chromosome in all species except for *Anser cygnoides* (Supplementary Material 3f). Different chromosome morphology (Fig. 4) with gene order conservation (Supplementary Material 3) indicates the presence

of centromere repositions in Anseriformes Z chromosomes. Amplification of heterochromatin (AT- and GC-rich) could occur in the pericentromeric region of the Z chromosome of *B. clangula* (Fig. 1 and Supplementary Material 2).

Physical size of the W chromosome is one of highly variable characteristics of the avian genome (Stiglec et al., 2007). Usually, the W chromosome of Neognathae is smaller than the Z chromosome and has lost most genes. Nonetheless, large W chromosomes in many avian species have been described (Rutkowska et al., 2012; De Oliveira T.D. et al., 2017). The size of the degenerated homologous sex chromosomes may increase due to the enrichment with repetitive elements or to autosomal translocations (Pala et al., 2012; Scharlt et al., 2016). Among the three species under study, a large W chromosome has been previously described only for *B. clangula* (Hammar, 1970; Beçak et al., 1973). C-banding of *B. clangula* metaphase chromosomes revealed that its W chromosome carries extended heterochromatic regions with a prominent AT-rich interstitial region (DAPI-positive) and GC-rich subtelomeric and pericentromeric regions (Chromomycin A3-positive) (Supplementary Material 2).

It is interesting that AT- and GC-heterochromatic regions overlapped. It may be explained by alternation of AT- and GC-rich repeats or the presence of repeats with a uniform distribution of AT/GC nucleotides in these regions. The painting probe containing the W chromosome covered the euchromatic region and subtelomere C-positive block, which may indicate the presence of some W-specific repeated sequences in the distal part of W. Remarkably, this probe hybridized also with the distal region of the q arm of the Z chromosome (Fig. 3). This may indicate a pseudoautosomal region or localization of amplified W-specific repeated sequences. Further investigation of *B. clangula* genomic architecture, repeatome, and whole-genome assembly may shed light on the evolutionary rearrangements of sex chromosomes.

Conclusion

Here, for the first time, we used stone curlew painting probes to analyze karyotypes of three Anatidae representatives. The detailed comparative cytogenetic maps cover all macrochromosomes and some microchromosomes and contain valuable information about the composition of the karyotypes, chromosome morphology, and localization of some repeated DNA sequences. Data of comparative chromosome painting together with dot plot (D-GENIES) analysis confirm the established view about the high level of syntenic group conservation among duck genomes.

Some microchromosomes in the examined duck karyotypes were found to bear amplified clusters of ribosomal DNA, telomeric repeats, or fractions of repeated DNA. The rDNA clusters were located on more than one pair of microchromosomes in Anatidae karyotypes – on four microchromosome pairs in *A. acuta* and two pairs in *B. clangula*. Also, microchromosomes with extended telomeres have been found in this work. This state of affairs may be a contributing factor to the difficulties with assembling avian genomes by conventional bioinformatic methods. Accumulation of heterochromatin in the *B. clangula* karyotype needs further research: karyotyping of more individuals and repeatome analysis.

References

- Abu-Almaaty A.H., Hassan M.K., El Bakary N.E.R., Ahmed S.H. Chromosomal evolution and molecular genetic analysis of four species of genus *Anas* (Aves: Anatidae). *Genetika*. 2019;51(1):104-119. DOI 10.2298/GENSR1901103A
- Beçak M.L., Beçak W., Roberts F.L., Shoffner R.N., Volp E.P. Aves. In: Chromosome Atlas: Fish, Amphibians, Reptiles, and Birds. Berlin: Springer, 1973;129-207
- Bulatova N.S., Panov E.N., Radzhabli S.I. Description of the karyotypes of several bird species of the USSR fauna. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 1971;199(6):1420-1423
- Burt D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2002;96(1-4):97-112
- Cabanettes F., Klopp C. D-GENIES: Dot plot large genomes in an interactive, efficient and simple way. *PeerJ*. 2018;6:e4958. DOI 10.7717/PEERJ.4958/TABLE-2
- Campagna L., Toews D.P.L. The genomics of adaptation in birds. *Curr. Biol.* 2022;32(20):R1173-R1186. DOI 10.1016/j.cub.2022.07.076
- Chowdhary B., Raudsepp T. Cytogenetics and physical gene maps. In: Bowling A.T., Ruvinsky A. (Eds.). The Genetics of the Horse. Oxon, UK: CABI Publishing, CAB International, 2000;171-241
- Christidis L. Chordata 3: Aves. In: John B., Kayano H., Levan A. (Eds.). Animal Cytogenetics. Vol. 4. Berlin: Gebrueder Borntraeger, 1990
- Coullin P., Bed'Hom B., Candelier J.J., Vettese D., Maucolin S., Moulin S., Galkina S.A., Bernheim A., Volobouev V. Cytogenetic repartition of chicken CR1 sequences evidenced by PRINS in Galliformes and some other birds. *Chromosome Res.* 2005;13(7):665-673. DOI 10.1007/s10577-005-1004-7
- Damas J., O'Connor R., Farré M., Lenis V.P.E., Martell H.J., Mandawala A., Fowler K., Joseph S., Swain M.T., Griffin D.K., Larkin D.M. Upgrading short-read animal genome assemblies to chromosome level using comparative genomics and a universal probe set. *Genome Res.* 2017;27(5):875-884. DOI 10.1101/gr.213660.116
- Damas J., Kim J., Farré M., Griffin D.K., Larkin D.M. Reconstruction of avian ancestral karyotypes reveals differences in the evolutionary history of macro- and microchromosomes. *Genome Biol.* 2018;19(1):155. DOI 10.1186/s13059-018-1544-8
- Damas J., O'Connor R.E., Griffin D.K., Larkin D.M. Avian chromosomal evolution. In: Kraus R.H.S. (Ed.). Avian Genomics in Ecology and Evolution: From the Lab into the Wild. Springer, 2019;69-92
- de Oliveira A.M., Souza G.M., Toma G.A., Dos Santos N., Dos Santos R.Z., Goes C.A.G., Deon G.A., Setti P.G., Porto-Foresti F., Utsunomia R., Gunski R.J., Del Valle Garnero A., Herculano Correa de Oliveira E., Kretschmer R., Cioffi M.B. Satellite DNAs, heterochromatin, and sex chromosomes of the wattled jacana (Charadriiformes; Jacanidae): a species with highly rearranged karyotype. *Genome*. 2024;67(4):109-118. DOI 10.1139/gen-2023-0082
- De Oliveira T.D., Kretschmer R., Bertocchi N.A., Degrandi T.M., De Oliveira E.H.C., De Cioffi M.B., Garnero A.D.V., Gunski R.J. Genomic organization of repetitive DNA in woodpeckers (aves, piciformes): Implications for karyotype and ZW sex chromosome differentiation. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169987. DOI 10.1371/journal.pone.0169987
- Degrandi T.M., Barcellos S.A., Costa A.L., Garnero A.D.V., Hass I., Gunski R.J. Introducing the bird chromosome database: An overview of cytogenetic studies in birds. *Cytogenet. Genome Res.* 2020;160(4):199-205. DOI 10.1159/000507768
- Delany M.E., Krupkin A.B., Miller M.M. Organization of telomere sequences in birds: evidence for arrays of extreme length and for in vivo shortening. *Cytogenet. Cell Genet.* 2000;90(1-2):139-145. DOI 10.1159/000015649
- Delany M.E., Gessaro T.M., Rodrigue K.L., Daniels L.M. Chromosomal mapping of chicken mega-telomere arrays to GGA9, 16, 28 and W using a cytogenomic approach. *Cytogenet. Genome Res.* 2007;117(1-4):54-63. DOI 10.1159/000103165
- Delany M.E., Robinson C.M., Goto R.M., Miller M.M. Architecture and organization of chicken microchromosome 16: Order of the NOR, MHC-Y, and MHC-B subregions. *J. Hered.* 2009;100(5):507-514. DOI 10.1093/jhered/esp044

- Derjusheva S., Kurganova A., Habermann F., Gaginskaya E. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome Res.* 2004; 12(7):715-723. DOI 10.1023/B:CHRO.0000045779.50641.00
- Dos Santos M.S., Kretschmer R., Silva F.A.O., Ledesma M.A., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., Del Valle Garner A., de Oliveira E.H.C., Gunski R.J. Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica.* 2015;143(5):535-543. DOI 10.1007/s10709-015-9851-4
- Dos Santos M. da S., Kretschmer R., Frankl-Vilches C., Bakker A., Gahr M., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., De Oliveira E.H.C. Comparative cytogenetics between two important songbird, models: The zebra finch and the canary. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170997. DOI 10.1371/journal.pone.0170997
- Ebied A.M., Hassan H.A., Abu Almaaty A.H., Yaseen A.E. Karyotypic characterization of ten species of birds. *Cytologia (Tokyo).* 2005; 70(2):181-194. DOI 10.1508/cytologia.70.181
- Ellegren H. The evolutionary genomics of birds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2013;44:239-259. DOI 10.1146/annurev-ecolsys-110411-160327
- Fillon V., Vignoles M., Crooijmans R.P.M.A., Groenen M.A.M., Zoorob R., Vignal A. FISH mapping of 57 BAC clones reveals strong conservation of synteny between Galliformes and Anseriformes. *Anim. Genet.* 2007;38(3):303-307. DOI 10.1111/j.1365-2052.2007.01578.x
- Gill F., Donsker D., Rasmussen P. (Eds.). IOC World Bird List (v13.2). 2023. DOI 10.14344/IOC.ML.13.2
- Graphodatsky A.S., Yang F., O'Brien P.C.M., Serdukova N., Milne B.S., Trifonov V., Ferguson-Smith M.A. A comparative chromosome map of the Arctic fox, red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding. *Chromosome Res.* 2000;8(3):253-263. DOI 10.1023/A:1009217400140
- Graphodatsky A.S., Yang F., O'Brien P.C.M., Perelman P., Milne B.S., Serdukova N., Kawada S.I., Ferguson-Smith M.A. Phylogenetic implications of the 38 putative ancestral chromosome segments for four canid species. *Cytogenet. Cell Genet.* 2001;92(3-4):243-247. DOI 10.1159/000056911
- Gregory T.R. The Animal Genome Size Database, 2023
- Griffin D.K., Haberman F., Masabanda J., O'Brien P., Bagga M., Sazanov A., Smith J., Burt D.W., Ferguson-Smith M., Wienberg J. Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: Tools for mapping the chicken genome. *Cytogenet. Cell Genet.* 1999;87(3-4):278-281. DOI 10.1159/000015449
- Griffin D.K., Robertson L.B.W., Tempest H.G., Skinner B.M. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet. Genome Res.* 2007;117(1-4):64-77. DOI 10.1159/000103166
- Griffin D.K., Robertson L.B., Tempest H.G., Vignal A., Fillon V., Crooijmans R.P.M.A., Groenen M.A.M., Deryusheva S., Gaginskaya E., Carré W., Waddington D., Talbot R., Völker M., Masabanda J.S., Burt D.W. Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. *BMC Genomics.* 2008;9:168. DOI 10.1186/1471-2164-9-168
- Grützner F., Zend-Ajus E., Stout K., Munsche S., Niveleau A., Nanda I., Schmid M., Haaf T. Chicken microchromosomes are hypermethylated and can be identified by specific painting probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 2001;93(3-4):265-269. DOI 10.1159/000056996
- Guillier-Gencik Z., Bernheim A., Coullin P. Generation of whole-chromosome painting probes specific to each chicken macrochromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* 1999;87(3-4):282-285. DOI 10.1159/000015450
- Guttenbach M., Nanda I., Feichtinger W., Masabanda J.S., Griffin D.K., Schmid M. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1-9 in nine different bird species. *Cytogenet. Genome Res.* 2003;103(1-2):173-184. DOI 10.1159/000076309
- Habermann F.A., Cremer M., Walter J., Kreth G., Von Hase J., Bauer K., Wienberg J., Cremer C., Cremer T., Solovei I. Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res.* 2001;9(7):569-584. DOI 10.1023/A:1012447318535
- Hammar B.O. The karyotypes of thirty-one birds. *Hereditas.* 1970; 65(1):29-58
- Hansmann T., Nanda I., Volobouev V., Yang F., Scharl M., Haaf T., Schmid M. Cross-species chromosome painting corroborates microchromosome fusion during karyotype evolution of birds. *Cytogenet. Genome Res.* 2009;126(3):281-304. DOI 10.1159/000251965
- Ijdo J.W., Wells R.A., Baldini A., Reenders S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(17):4780. DOI 10.1093/nar/19.17.4780
- Islam F.B., Uno Y., Nunome M., Nishimura O., Tarui H., Agata K., Matsuda Y. Comparison of the chromosome structures between the chicken and three anserid species, the domestic duck (*Anas platyrhynchos*), muscovy duck (*Cairina moschata*), and chinese goose (*Anser cygnoides*), and the delineation of their karyotype evolution by comparison. *J. Poult. Sci.* 2014;51(1):1-13. DOI 10.2141/jpsa.0130090
- Itoh Y., Arnold A.P. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. *Chromosome Res.* 2005;13(1):47-56. DOI 10.1007/s10577-005-6602-x
- Kiazim L.G., O'Connor R.E., Larkin D.M., Romanov M.N., Narushin V.G., Brazhnik E.A., Griffin D.K. Comparative mapping of the macrochromosomes of eight avian species provides further insight into their phylogenetic relationships and avian karyotype evolution. *Cells.* 2021;10(2):362. DOI 10.3390/cells10020362
- Kretschmer R., de Souza M.S., Furo I.O., Romanov M.N., Gunski R.J., Garner A.D.V., de Freitas T.R.O., de Oliveira E.H.C., O'Connor R.E., Griffin D.K. Interspecies chromosome mapping in caprimulgiformes, piciformes, suliformes, and trogoniformes (Aves): Cytogenomic insight into microchromosome organization and karyotype evolution in birds. *Cells.* 2021;10(4):826. DOI 10.3390/cells10040826
- Liehr T., Kreskowski K., Ziegler M., Piaszinski K., Rittscher K. The Standard FISH Procedure. In: Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH). Springer Protocols Handbooks. Berlin: Springer, 2017;109-118. DOI 10.1007/978-3-662-52959-1_9
- Maden B.E.H., Dent C.L., Farrell T.E., Garde J., McCallum F.S., Wakeman J.A. Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S-rRNA and 28 S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones. *Biochem. J.* 1987;246(2):519-527. DOI 10.1042/bj2460519
- Masabanda J.S., Burt D.W., O'Brien P.C.M., Vignal A., Fillon V., Walsh P.S., Cox H., Tempest H.G., Smith J., Habermann F., Schmid M., Matsuda Y., Ferguson-Smith M.A., Crooijmans R.P.M.A., Groenen M.A.M., Griffin D.K. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: The first complete avian karyotype. *Genetics.* 2004;166(3):1367-1373. DOI 10.1534/genetics.166.3.1367
- Nakatani Y., Takeda H., Kohara Y., Morishita S. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res.* 2007;17(9):1254-1265. DOI 10.1101/gr.6316407
- Nanda I., Schrama D., Feichtinger W., Haaf T., Scharl M., Schmid M. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma.* 2002;111(4):215-227. DOI 10.1007/s00412-002-0206-4
- Nanda I., Benisch P., Fetting D., Haaf T., Schmid M. Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1-10 in different avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. *Cytogenet. Genome Res.* 2011;132(3):165-181. DOI 10.1159/000322358
- Nie W., O'Brien P.C.M., Ng B.L., Fu B., Volobouev V., Carter N.P., Ferguson-Smith M.A., Yang F. Avian comparative genomics: Reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicnemus*, Charadriiformes) – An atypical species with low diploid number. *Chromosome Res.* 2009;17(1):99-113. DOI 10.1007/s10577-009-9021-6
- Nie W., O'Brien P.C.M., Fu B., Wang J., Su W., He K., Bed'Hom B., Volobouev V., Ferguson-Smith M.A., Dobigny G., Yang F. Multidi-


- rectional chromosome painting substantiates the occurrence of extensive genomic reshuffling within Accipitriformes. *BMC Evol. Biol.* 2015;15(1):205. DOI 10.1186/s12862-015-0484-0
- Nishida-Umehara C., Tsuda Y., Ishijima J., Ando J., Fujiwara A., Matsuda Y., Griffin D.K. The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Res.* 2007;15(6):721-734. DOI 10.1007/s10577-007-1157-7
- O'Connor R.E., Kretschmer R., Romanov M.N., Griffin D.K. A bird's-eye view of chromosomal evolution in the class aves. *Cells.* 2024;13(4):310. DOI 10.3390/cells13040310
- Pala I., Naurin S., Stervander M., Hasselquist D., Bensch S., Hansson B. Evidence of a neo-sex chromosome in birds. *Heredity (Edinb.)*. 2012;108(3):264-272. DOI 10.1038/hdy.2011.70
- Prum R.O., Berv J.S., Dornburg A., Field D.J., Townsend J.P., Lemmon E.M., Lemmon A.R. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature.* 2015;526(7574):569-573. DOI 10.1038/nature15697
- Rodrigue K.L., May B.P., Famula T.R., Delany M.E. Meiotic instability of chicken ultra-long telomeres and mapping of a 2.8 megabase array to the W-sex chromosome. *Chromosome Res.* 2005;13(6):581-591. DOI 10.1007/s10577-005-0984-7
- Rodrigues B.S., de Assis M.D.F.L., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., De Oliveira E.H.C. Chromosomal studies on *Coscoroba coscoroba* (Aves: Anseriformes) reinforce the Coscoroba-Cereopsis clade. *Biol. J. Linn. Soc.* 2014;111(2):274-279. DOI 10.1111/bij.12202
- Romanenko S.A., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Kulemzina A.I., Beklemisheva V.R., Gladkikh O.L., Lemskaya N.A., Interesova E.A., Korentovich M.A., Vorobieva N.V., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Mol. Cytogenet.* 2015;8(1):90. DOI 10.1186/s13039-015-0194-8
- Rutkowska J., Lagisz M., Nakagawa S. The long and the short of avian W chromosomes: No evidence for gradual W shortening. *Biol. Lett.* 2012;8(4):636-638. DOI 10.1098/rsbl.2012.0083
- Schartl M., Schmid M., Nanda I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma.* 2016;125(3):553-571. DOI 10.1007/s00412-015-0569-y
- Schmid M., Nanda I., Hoehn H., Schartl M., Haaf T., Buerstedde J.M., Arakawa H., Caldwell R.B., Weigend S., Burt D.W., Smith J., Griffin D.K., Masabanda J.S., Groenen M.A.M., Crooijmans R.P.M.A., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Vignoles M., Garriques A., Gellin J., Rodionov A.V., Galkina S.A., Lukina N.A., Ben-Ari G., Blum S., Hillel J., Twito T., Lavi U., David L., Feldman M.W., Delany M.E., Conley C.A., Fowler V.M., Hedges S.B., Godbout R., Katyal S., Smith C., Hudson Q., Sinclair A., Mizuno S. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(4):415-479. DOI 10.1159/000084205
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971;298(7731):971-972. DOI 10.1016/s0140-6736(71)90287-x
- Shetty S., Griffin D.K., Graves J.A.M. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 1999;7(4):289-295. DOI 10.1023/A:1009278914829
- Shibusawa M., Minai S., Nishida-Umehara C., Suzuki T., Mano T., Yamada K., Namikawa T., Matsuda Y. A comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail. *Cytogenet. Cell Genet.* 2001;95(1-2):103-109. DOI 10.1159/000057026
- Shibusawa M., Nishida-Umehara C., Masabanda J., Griffin D.K., Isobe T., Matsuda Y. Chromosome rearrangements between chicken and guinea fowl defined by comparative chromosome painting and FISH mapping of DNA clones. *Cytogenet. Genome Res.* 2002;98(2-3):225-230. DOI 10.1159/000069813
- Shibusawa M., Nishibori M., Nishida-Umehara C., Tsudzuki M., Masabanda J., Griffin D.K., Matsuda Y. Karyotypic evolution in the Galliformes: An examination of the process of karyotypic evolution by comparison of the molecular cytogenetic findings with the molecular phylogeny. *Cytogenet. Genome Res.* 2004;106(1):111-119. DOI 10.1159/00007857
- Smith J., Bruley C.K., Paton I.R., Dunn I., Jones C.T., Windsor D., Morrice D.R., Law A.S., Masabanda J., Sazanov A., Waddington D., Fries R., Burt D.W. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Anim. Genet.* 2000;31(2):96-103. DOI 10.1046/j.1365-2052.2000.00565.x
- Srikulnath K., Ahmad S.F., Singchat W., Panthum T. Why do some vertebrates have microchromosomes? *Cells.* 2021;10(9):2182. DOI 10.3390/cells10092182
- Stiglec R., Ezaz T., Graves J.A.M. A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2007;117(1-4):103-109. DOI 10.1159/000103170
- Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 1972;75(1):304-306. DOI 10.1016/0014-4827(72)90558-7
- Sun Z., Pan T., Hu C., Sun L., Ding H., Wang H., Zhang C., Jin H., Chang Q., Kan X., Zhang B. Rapid and recent diversification patterns in Anseriformes birds: Inferred from molecular phylogeny and diversification analyses. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184529. DOI 10.1371/journal.pone.0184529
- Takagi N., Makino S. A revised study on the chromosomes of three species of birds. *Caryologia.* 1966;19(4):443-455. DOI 10.1080/00087114.1966.10796235
- Telenius H., Pelmeur A.H., Tunnacliffe A., Carter N.P., Behmel A., Ferguson-Smith M.A., Nordenrkjold M., Pfaffner R., Ponder B.A.J. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosom. Cancer.* 1992;4(3):251-263. DOI 10.1002/gcc.2870040311
- Uno Y., Nishida C., Hata A., Ishishita S., Matsuda Y. Molecular cytogenetic characterization of repetitive sequences comprising centromeric heterochromatin in three Anseriformes species. *PLoS One.* 2019;14(3):e0214028. DOI 10.1371/journal.pone.0214028
- Van Tuinen M., Hedges S.B. Calibration of avian molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* 2001;18(2):206-213. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003794
- Wang J., Su W., Hu Y., Li S., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., Yang F., Nie W. Comparative chromosome maps between the stone curlew and three ciconiiform species (the grey heron, little egret and crested ibis). *BMC Ecol. Evol.* 2022;22(1):23. DOI 10.1186/s12862-022-01979-x
- Wójcik E., Smalec E. Description of the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) karyotype. *Folia Biol.* 2007;55(3-4):115-120
- Zimmer R., King W.A., Verrinder Gibbins A.M. Generation of chicken Z-chromosome painting probes by microdissection for screening large-insert genomic libraries. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997;78(2):124-130. DOI 10.1159/000134643
- Zlotina A., Maslova A., Kosyakova N., Al-Rikabi A.B.H., Liehr T., Krasikova A. Heterochromatic regions in Japanese quail chromosomes: comprehensive molecular-cytogenetic characterization and 3D mapping in interphase nucleus. *Chromosome Res.* 2019;27(3):253-270. DOI 10.1007/s10577-018-9597-9

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

Received February 21, 2024. Revised June 13, 2024. Accepted August 8, 2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-85

Транскрипционный фактор TCF4: структура, функции и ассоциированные заболевания

Р.Р. Савченко , Н.А. Скрыбин Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, Томск, Россия renata.savchenko@medgenetics.ru

Аннотация. На сегодняшний день имеются ограниченные знания об основных характеристиках генов человека, их структуре, функции и механизмах регуляции экспрессии. Биологическая роль около 20 % белковых продуктов генов до сих пор не установлена, а молекулярные функции известной части протеома остаются недостаточно изученными. Данное обстоятельство ограничивает прогресс как фундаментальных, так и прикладных биологических и медицинских наук, в особенности в случае терапии наследственных болезней, патогенез которых обусловлен наличием вариантов в нуклеотидной последовательности отдельных генов. В связи с этим возрастает необходимость проведения исследований, направленных на изучение функций генов, а также молекулярных патогенетических путей, связанных с развитием моногенных заболеваний. Наша статья посвящена гену *TCF4*, кодирующему широко экспрессируемый фактор транскрипции, важный для развития и функционирования нервной системы. К настоящему времени установлено, что патогенные варианты в этом гене приводят к развитию редкого генетического заболевания, известного как синдром Питта–Хопкинса, а полиморфные варианты в *TCF4* ассоциированы с рядом социально значимых заболеваний, представленных различными психическими расстройствами. Молекулярные механизмы патогенеза подобных состояний по-прежнему остаются неизученными, а знания о вышестоящей регуляции TCF4 и его нижестоящих генах-мишенях ограничены. Сложность структурной организации и особенности регуляции экспрессии гена обеспечивают многообразие изоформ TCF4, что затрудняет понимание молекулярных функций белка. В обзоре рассмотрены известные данные о структуре и функциях фактора транскрипции TCF4. Обсуждаются потенциальные гены-мишени и возможные патогенетические механизмы, обусловленные потерей функции этого белка, выявленные в исследованиях на животных и клеточных моделях синдрома Питта–Хопкинса. Рассмотрены преимущества и ограничения потенциальных стратегий терапии указанного синдрома, основанные на компенсации дозы TCF4 или воздействии на молекулярные мишени изучаемого транскрипционного фактора.

Ключевые слова: TCF4; синдром Питта–Хопкинса; BHLH; психические расстройства; расстройства аутистического спектра; терапия синдрома Питта–Хопкинса.


Для цитирования: Савченко Р.Р., Скрыбин Н.А. Транскрипционный фактор TCF4: структура, функции и ассоциированные заболевания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):770-779. DOI 10.18699/vjgb-24-85

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 23-75-01138.

Transcription factor TCF4: structure, function, and associated diseases

R.R. Savchenko , N.A. Skryabin 

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

 renata.savchenko@medgenetics.ru

Abstract. Our understanding of human genes – particularly their structure, functions, and regulatory mechanisms – is still limited. The biological role of approximately 20 % of human proteins has not been established yet, and the molecular functions of the known part of the proteome remain poorly understood. This hinders progress in basic and applied biological and medical sciences, especially in treating hereditary diseases, which are caused by mutations and polymorphic variants in individual genes. Therefore, it is crucial to comprehend the mechanisms of protein functioning to address this problem. This further emphasizes the importance of investigating gene functions and molecular pathogenetic pathways associated with single-gene inherited diseases. This review focuses on the *TCF4* gene that encodes a transcription factor crucial for nervous system development and functioning. Pathogenic variants in this gene have been linked to a rare genetic disorder, Pitt–Hopkins syndrome, and *TCF4* polymorphic variants are associated with several socially significant diseases, including various psychiatric disorders. The pathogenetic mechanisms of these conditions remain unexplored, and the knowledge about *TCF4* upregulation and its target genes is limited. TCF4 can be expressed in various isoforms due to the complex structure and regulation of its gene, which complicates the investigation of the protein's functions. Here, we consider the structure and functions of the TCF4 transcription factor. We discuss

its potential target genes and the possible loss-of-function pathogenetic mechanisms identified in animal and cellular models of Pitt–Hopkins syndrome. The review also examines the advantages and limitations of potential therapies for Pitt–Hopkins syndrome that are based on TCF4 dosage compensation or altering the activity of TCF4 target genes.

Key words: TCF4; Pitt–Hopkins syndrome; bHLH; mental disorders; autism spectrum disorders; Pitt–Hopkins syndrome therapy.

For citation: Savchenko R.R., Skryabin N.A. Transcription factor TCF4: structure, function, and associated diseases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):770–779. DOI 10.18699/vjgb-24-85

Введение

На сегодняшний день одна из важнейших проблем медицинской генетики связана с недостаточным пониманием роли белковых продуктов генов, которые вовлечены в молекулярные пути, лежащие в основе развития ряда наследственных болезней. Эта проблема становится особенно актуальной в случае транскрипционных факторов, поскольку белки данной группы регулируют экспрессию многих других генов, обладают плеiotропными эффектами и имеют критическое значение для нормального протекания различных биологических процессов. Один из подобных транскрипционных факторов кодируется геном *TCF4*. Патогенные варианты в этом гене служат причиной развития синдрома Питта–Хопкинса (Amiel et al., 2007; Brockschmidt et al., 2007; Zweier et al., 2007), а полиморфные варианты ассоциированы с различными психическими расстройствами, включая шизофрению, биполярное расстройство, большое депрессивное расстройство и посттравматическое стрессовое расстройство (Stefansson et al., 2009; Smoller et al., 2013; Wray et al., 2018).

Белок TCF4 имеет критическое значение для развития и функционирования мозга, участвуя в дифференцировке и миграции нервных клеток, регуляции возбудимости нейронов, нейрональной пластичности и некоторых других процессах (Imayoshi, Kageyama, 2014; Kennedy et al., 2016; Li H. et al., 2019; Mesman et al., 2020; Phan et al., 2020). Несмотря на большое количество данных, указывающих на важную роль *TCF4*, молекулярные механизмы, посредством которых патогенные варианты в этом гене приводят к нарушению развития и функционирования клеток нервной системы, остаются практически неизученными. Настоящий обзор направлен на обобщение информации в области структуры и функций TCF4, его известных молекулярных мишеней, заболеваний, связанных с вариантами в *TCF4*, а также возможных подходов к их терапии.

Структура TCF4, особенности экспрессии и известные функции

Ген *TCF4* (также известный как *ITF2*, *PTHS*) локализован на хромосоме 18 в регионе 18q21.2 и содержит 41 экзон, из которых 20 экзонов являются альтернативными 5'-экзонами (некодирующие белок экзоны, включение или исключение которых из зрелой мРНК регулирует экспрессию более длинных или коротких изоформ белка), 20 – внутренними белок-кодирующими экзонами и один – 3'-некодирующим экзоном (Sepp et al., 2011). *TCF4* кодирует фактор транскрипции, содержащий основной структурный мотив спираль-петля-спираль (от англ. basic helix-loop-helix, bHLH). Белки этой группы содержат ДНК-связывающий домен и, образуя гомо- и гетеродимеры, регулируют экспрессию генов. В зависимости от

типов образуемых ими димеров, паттерна экспрессии и специфичности связывания ДНК, белки, содержащие bHLH, подразделяют на шесть групп. Транскрипционный фактор TCF4 относится к группе E-белков (или bHLH-белков класса I), распознающих последовательности E-box (CANNTG), расположенные в промоторных и энхансерных областях генов-мишеней (Schoof et al., 2020). Домен bHLH представляет собой высококонсервативный мотив, состоящий из региона основных аминокислот, за которым следует две амфипатические α -спирали, соединенные петлей. Регион основных аминокислот напрямую связывается с последовательностью E-box, в то время как α -спирали обеспечивают димеризацию.

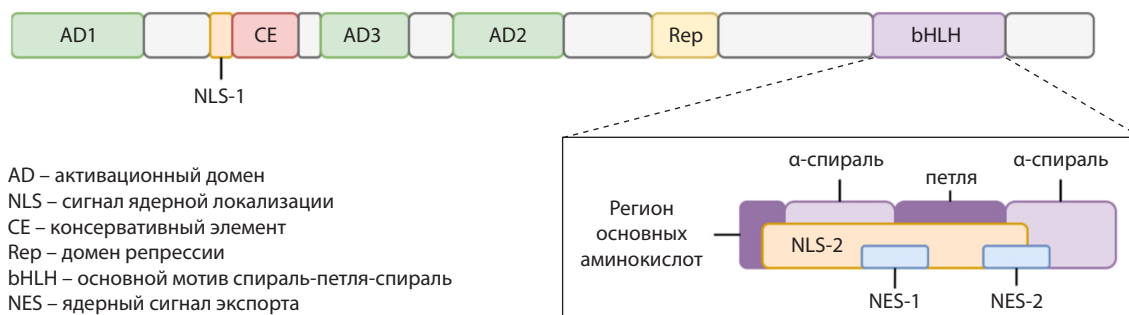
Наличие альтернативных сайтов инициации транскрипции, расположенных перед некодирующими экзонами 1, 3, 4, 5, 7, 8 и 10, определяет по меньшей мере 18 изоформ TCF4, содержащих относительно консервативные C-концевые домены основного структурного мотива спираль-петля-спираль и отличающихся N-концевыми участками, ответственными за регуляцию транскрипции. Однако следует отметить, что разнообразие транскриптов *TCF4* еще выше за счет альтернативного сплайсинга внутренних кодирующих экзонов (Teixeira et al., 2021).

Полноразмерные транскрипты *TCF4* включают следующие структурные элементы: bHLH-домен, активационные домены (AD1, AD2 и AD3), внутримолекулярные регуляторные домены CE и Rep, сигналы ядерной локализации NLS-1 и NLS-2, ядерные сигналы экспорта NES-1 и NES-2, последовательность из четырех аминокислотных остатков RSRS (рис. 1).

Помимо домена bHLH, активационные домены AD1, AD2 и AD3 могут совместно или независимо друг от друга регулировать экспрессию генов-мишеней в зависимости от типа клеток. Показано, что домен AD1 связывает коактиваторы и корепрессоры транскрипции. Домен AD2 обладает способностью связывать коактиваторы транскрипции, однако о взаимодействии с корепрессорами данных нет. Коактиваторы и корепрессоры транскрипции конкурируют за связывание с доменом AD1, в результате чего TCF4 способен как активировать, так и подавлять экспрессию генов (Teixeira et al., 2021).

Домен AD3 напрямую взаимодействует с субъединицей TAF4 общего транскрипционного фактора II D, что приводит к усилению преинициации РНК-полимеразы II на генах-мишенях, однако как именно AD3 участвует в регуляции экспрессии генов, осуществляемой TCF4, пока неясно (Teixeira et al., 2021).

Транскрипционная активность *TCF4* регулируется также упомянутыми ранее доменами CE и Rep. Консервативный элемент (conserved element, CE), расположенный между активационными доменами AD1 и AD3, может



AD – активационный домен
NLS – сигнал ядерной локализации
CE – консервативный элемент
Rep – домен репрессии
bHLH – основной мотив спираль-петля-спираль
NES – ядерный сигнал экспорта

Рис. 1. Схематическое изображение структуры полноразмерного белка TCF4.

Рисунок взят из статьи (Teixeira et al., 2021), с изменениями.

подавлять активность AD1. Домен репрессии (repression domain, Rep), расположенный между AD2 и bHLH, способен подавлять активность AD1 и AD2. Вероятно, оба этих домена могут предотвращать рекрутирование транскрипционных кофакторов и, как следствие, подавлять AD1-опосредованную активацию или репрессию транскрипции (Teixeira et al., 2021).

Наконец, наличие мотива из четырех аминокислотных остатков RSRS (Arg-Ser-Arg-Ser), расположенного между доменами Rep и bHLH, тоже может приводить к снижению транскрипционной активности.

Сложность структурной организации *TCF4*, а также особенности регуляции экспрессии данного гена обеспечивают многообразие изоформ *TCF4*, которые могут содержать разные структурные домены. Поскольку все транскрипты *TCF4* включают экзоны 10–20, все изоформы кодируемого белка содержат активационные домены AD2 и AD3, а также домены bHLH, Rep, NLS-2, NES-1 и NES-2. Только четыре более длинные изоформы белка содержат полный активационный домен AD1, в то время как другие изоформы содержат только его часть либо не содержат вообще (Sepp et al., 2011). Кроме того, в литературе описаны так называемые Δ-изоформы, которые отличаются отсутствием доменов NLS-1 и CE. Наконец, наличие альтернативных сайтов сплайсинга в экзоне 18 приводит к включению или исключению сегмента, кодирующего последовательность RSRS, присутствующего в положительных (+) и отсутствующего в отрицательных (–) изоформах белка (Sepp et al., 2011). Вопрос о том, чем различные изоформы отличаются друг от друга с точки зрения регуляции транскрипции, на сегодняшний день остается открытым.

Как и для большинства генов, кодирующих E-белки, экспрессия *TCF4* характерна практически для всех тканей организма и достигает максимальных значений в структурах головного мозга (The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org>). Некоторые транскрипты *TCF4* являются тканеспецифичными, тогда как другие имеют широкий пространственный паттерн экспрессии. Более того, количественное соотношение одних и тех же транскриптов может варьировать в разных тканях. Анализ экспрессии, проведенный с помощью ОТ-ПЦР, показал, что большинство транскриптов *TCF4* экспрессируются в головном мозге, за исключением пяти, обнаруженных в семенниках (Sepp et al., 2011). Экспрессия *TCF4* регули-

руется также в процессе онтогенеза, причем максимальная активность наблюдается в период внутриутробного развития (Sepp et al., 2011). Показано, что экспрессия *TCF4* в головном мозге значительно возрастает в конце пренатального периода и снижается до базового уровня, сохраняющегося на протяжении всей жизни, у новорожденных (Li M. et al., 2018).

У человека белок TCF4 экспрессируется в переднем мозге и желудочковой системе головного мозга во время развития плода и сохраняется в переднем мозге и мозжечке у взрослых. Кроме головного мозга, TCF4 обнаруживается в олигодендроцитах спинного мозга (Chen H.Y. et al., 2021).

Большое количество изоформ TCF4 осложняет понимание молекулярных функций данного белка. Функциональные особенности конкретные изоформ TCF4 зависят от того, какой 5'-экзон и внутренние экзоны включены в транслируемый транскрипт. В зависимости от структуры изоформ осуществляется дифференциальная регуляция как субклеточной локализации, так и особенностей транскрипционной регуляции. Например, изоформы, содержащие NLS, локализованы в ядре, в то время как изоформам, не имеющим NLS, требуется партнер по гетеродимеризации, чтобы получить доступ к ядру (Chen H.Y. et al., 2021).

Как было отмечено ранее, TCF4 является транскрипционным фактором. Его связывают с регуляцией гемопоэза, миогенеза, нейрогенеза, меланоцитогенеза, остеогенеза, а также с дифференцировкой эндотелиальных клеток, клеток молочной железы и клеток Сертоли (Teixeira et al., 2021). Помимо регуляции транскрипции, TCF4, по-видимому, имеет критическое значение для нормального развития и функционирования нервной системы. Данный белок образует гетеродимеры с транскрипционными факторами ATOH1, ASCL1, NEUROD1 и NEUROD2, играющими важную роль в развитии нервной системы (Wittmann, Häberle, 2018). Известно, что продукт гена *TCF4* важен для развития и нормального функционирования головного мозга, участвуя в таких процессах, как дифференцировка нейрональных клеток-предшественников в нейроны, олигодендроциты и астроциты (Imayoshi, Kageyama, 2014), созревание, миграция и функционирование нейронов, миелинизация олигодендроцитов, синаптическая пластичность и др. (Kennedy et al., 2016; Li H. et al., 2019; Mesman et al., 2020; Phan et al., 2020).

Заболевания, ассоциированные с полиморфными вариантами в *TCF4*

Вариант	Частота	ОШ (95 % ДИ)	Заболевание	Литературный источник
rs9960767[C]	0.06	1.3 (1.11–1.51), $p = 0.001$	Шизофрения	Stefansson et al., 2009
rs17512836[C]	0.02	1.23 (1.14–1.31), $p = 1.05 \times 10^{-6}$	Шизофрения, БР, РАС	Ripke et al., 2011; Smoller et al., 2013
rs4309482[A]	0.58	1.09 (1.06–1.12), $p = 7.8 \times 10^{-9}$	Шизофрения	Steinberg et al., 2011
rs9960767[C]	0.03	0.68 (0.41–1.13), $p = 0.134$		Bocharova et al., 2017
rs17594526[T]	0.01	0.60 (0.25–1.42), $p = 0.238$		Bocharova et al., 2017
rs12958048 [A]	0.33	1.03 (н. д.), $p < 1 \times 10^{-5}$	Большое депрессивное расстройство	Wray et al., 2018
rs2123392 [C]	Н. д.	Н. д.	ПТСР	Gelernter et al., 2019
rs613872 [G]	0.37	5.47 (3.75–7.99), $p = 1 \times 10^{-18}$	Эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса	Baratz et al., 2010
rs784257[G]	0.48	4.94 (4.45–5.58), $p = 2.5 \times 10^{-200}$		Afshari et al., 2017
rs1452787[G]	0.23	0.75 (0.68–0.83), $p = 2.61 \times 10^{-8}$	Склерозирующий холангит	Ellinghaus et al., 2013

Примечание. ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; БР – биполярное расстройство; РАС – расстройства аутистического спектра; ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство; н. д. – нет данных.

Заболевания, ассоциированные с *TCF4*

В ряде исследований говорится о возможной роли *TCF4* в патогенезе различных социально значимых заболеваний. Широкогеномные ассоциативные исследования показывают, что полиморфные варианты в *TCF4*, преимущественно локализованные в некодирующих областях гена, ассоциированы с разными психическими расстройствами, включая шизофрению (Stefansson et al., 2009; Ripke et al., 2011; Steinberg et al., 2011; Smoller et al., 2013; Bocharova et al., 2017), биполярное расстройство и расстройства аутистического спектра (Smoller et al., 2013), большое депрессивное расстройство (Wray et al., 2018) и посттравматическое стрессовое расстройство (Gelernter et al., 2019). Кроме того, варианты в *TCF4* ассоциированы с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса (Afshari et al., 2017; Fautsch et al., 2021) и склерозирующим холангитом (Ellinghaus et al., 2013). Однако на сегодняшний день неизвестно, являются ли данные полиморфные варианты причиной развития указанных заболеваний. Исключение составляет эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса; большинство пациентов с этим диагнозом характеризуются экспансией тринуклеотидного повтора (CTG)_n в интроне 3 гена *TCF4*, приводящей к ошибкам сплайсинга (Du et al., 2015; Папанян и др., 2019) (см. таблицу).

В 2007 г. в нескольких независимых исследованиях было показано, что гетерозиготное носительство патогенных вариантов в гене *TCF4* приводит к развитию редкого наследственного заболевания – синдрома Питта–Хопкинса (СПХ) (Amiel et al., 2007; Brockschmidt et al., 2007; Zweier et al., 2007). Несмотря на фенотипические различия, для большинства пациентов с данным синдромом характерен специфический набор дисморфических черт лица в сочетании с умственной отсталостью, нарушениями сенсомоторной активности, задержкой речи, а также генерализованной мышечной гипотонией. Около 78 % пациентов часто совершают стереотипные и интенсивные повторяющиеся движения, что позволяет отнести СПХ к расстройствам аутистического спектра. Приблизительно у половины пациентов с СПХ наблюдаются аномальные паттерны дыхания и примерно у трети развиваются эпилептические припадки. Кроме того, с помощью магнит-

но-резонансной томографии у пациентов с СПХ был выявлен ряд аномалий головного мозга, включая маленькое или отсутствующее мозолистое тело, большие желудочки и аномальную форму задней черепной ямки (Teixeira et al., 2021).

Спектр мутаций в *TCF4*, обнаруженных у пациентов с СПХ, включает миссенс- (~15 % случаев), нонсенс- (~15 %) и точечные мутации сайта сплайсинга (~10 %), небольшие инсерции или делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания (~30 %), а также транслокации и большие делеции, частично или полностью охватывающие *TCF4* (~30 %) (Teixeira et al., 2021). По некоторым оценкам, распространенность СПХ, обусловленного хромосомными делециями, в мире составляет 1/34000–1/41000 (Rosenfeld et al., 2009).

В зависимости от локализации и типа мутации белковые продукты *TCF4* поражаются по-разному. Большинство миссенс-мутаций затрагивают экзон 19, кодирующий домен bHLH. Часть миссенс-мутаций затрагивает экзоны 15 и 18, кодирующие активационный домен AD2 и регуляторный домен Rep соответственно. Поскольку все транскрипты *TCF4* содержат данные экзоны, описанные выше патогенные варианты приводят к нарушению всех изоформ белка. Большинство нонсенс-мутаций, мутаций сдвига рамки считывания и мутаций сайтов сплайсинга тоже приводят к повреждению всех изоформ белка, однако если перечисленные мутации поражают 8-й и 9-й экзоны или локализируются до экзона 10a-с, то Δ-изоформы и более короткие изоформы *TCF4* сохраняются неизменными. Некоторые транслокации и делеции охватывают только начальные экзоны (с 1-го по 4-й) или промежуточные экзоны (с 5-го по 9-й), сохраняя промежуточные и более короткие изоформы соответственно (Sepp et al., 2012).

Влияние структурного разнообразия и специфического для разных клеток паттерна экспрессии *TCF4* на физиологические процессы остается недостаточно изученным, однако предполагается, что разные типы мутаций *TCF4* у индивидов с СПХ могут по-разному влиять на кодируемый белок, обеспечивая фенотипическую изменчивость, наблюдаемую среди пациентов (Bedeschi et al., 2017). К примеру, миссенс-мутации в области, кодирующей

основной структурный мотив «спираль-петля-спираль», или инсерции, приводящие к сдвигу рамки считывания и удлинению аминокислотной последовательности белка, приводят к нарушениям ДНК-связывающей или транскрипционной функций в зависимости от партнера по димеризации (Sepp et al., 2012). Патогенные варианты, затрагивающие область bHLH-домена, ответственную за димеризацию, дестабилизируют белок, тогда как миссенс-мутации вне домена bHLH не вызывают явных функциональных нарушений (Chen H.Y. et al., 2021).

Большинство патогенных вариантов в *TCF4*, встречающихся у пациентов с СПХ, приводят к состоянию гаплогенности, поскольку ограничивают экспрессию определенных или всех транскриптов белка только одним аллелем. В то же время некоторые миссенс-мутации служат причиной частичной или полной потери функции TCF4 в качестве регулятора транскрипции, не влияя при этом на способность к димеризации *in vitro*, что, по-видимому, свидетельствует о доминантно-негативном эффекте данных патогенных вариантов (Forrest et al., 2013). Имеет ли место наблюдаемый эффект *in vivo*, на сегодняшний день неясно; предположительно, он будет очень слабым из-за нестабильности димеров с мутантным TCF4 (Teixeira et al., 2021). Таким образом, очевидно, что СПХ возникает в результате нарушений регуляции экспрессии генов, опосредованной TCF4. Вопрос о том, как именно подобные нарушения могут запускать патофизиологический процесс, остается открытым. J.R. Teixeira с коллегами (2021) предполагают, что этот процесс может быть связан с общими функциями E-белков в регуляции клеточного цикла и специфической ролью TCF4 в процессе дифференцировки клеток.

Молекулярные пути и потенциальные гены-мишени, регулируемые TCF4

К настоящему времени достигнут существенный прогресс в области идентификации вышестоящих регуляторов и нижестоящих генов-мишеней транскрипционного фактора TCF4. Показано, что фармакологическая активация сигнального пути WNT/ β -катенин в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), полученных из нейрональных прогениторных клеток и нейронов пациентов с СПХ, влечет за собой возрастание экспрессии *TCF4* (Hennig et al., 2017). К аналогичному эффекту приводит модификация хроматина, опосредованная ингибированием гистоновых деацетилаз I класса (Kennedy et al., 2016; Hennig et al., 2017). Другими вышестоящими регуляторами, повышающим экспрессию *Tcf4*, выступают TCF3, являющийся членом подгруппы E-белков, и транскрипционный фактор ZAC1 (Schmidt-Edelkraut et al., 2014; Li H. et al., 2019). Авторы предполагают, что регуляция *Tcf4* с помощью TCF3 и других неидентифицированных факторов транскрипции имеет решающее значение для нормального развития коры головного мозга (Li H. et al., 2019) (рис. 2).

В нескольких работах с использованием технологии ChIP-Seq были выявлены прямые мишени TCF4, среди которых *Bmp7* (Chen T. et al., 2016), *Nrxn1* (D'Rozario et al., 2016), *Gadd45g* (Sepp et al., 2017), *Gjb2* и *Plp1* (Wedel et al., 2020). В ряде экспериментов, проведенных на кле-

точных и животных моделях, обнаружены следующие молекулярные мишени TCF4: *Scn10a* (Nav1.8) и *Kcnq1* (Kv7.1) (Rannals et al., 2016; Martinowich et al., 2022), *Wnt7b* (Wang et al., 2020), *Gadd45g*, *Syn* и *Dlg1* (Tamberg et al., 2020). В совокупности результаты данных исследований указывают на то, что TCF4 является регулятором генов, экспрессирующихся и участвующих в развитии мозга, дифференцировке нервных клеток, возбудимости нейронов, функционировании синапсов и выживании (см. рис. 2).

В то же время, согласно данным литературы, TCF4 имеет более 10000 сайтов связывания в геноме, которые могут быть отнесены к более чем 5000 генов (Forrest et al., 2018; Xia et al., 2018). В свете этого становится очевидным, что подавляющее большинство молекулярных мишеней изучаемого транскрипционного фактора по-прежнему остаются неидентифицированными. Поэтому задача выявления молекулярных путей и потенциальных мишеней, регулируемых TCF4, имеет большое значение с фундаментальной точки зрения для изучения процессов, регулируемых транскрипционными факторами. Кроме того, понимание механизмов функционирования генных сетей и поиск ключевых молекулярных мишеней TCF4 могут существенно повлиять на разработку терапевтических стратегий в случаях *TCF4*-ассоциированных заболеваний.

На сегодняшний день известно несколько исследований с использованием животных моделей, в которых были предприняты попытки оценить изменения транскрипционного профиля, обусловленные мутациями *TCF4*. В работах, выполненных на модельных системах грызунов, в качестве нижестоящих мишеней TCF4 рассматриваются гены, кодирующие калиевые и натриевые ионные каналы – *Kcnq1* и *Scn10a* (Rannals et al., 2016; Martinowich et al., 2022). Оба исследования демонстрируют возрастание экспрессии данных генов на фоне потери функции TCF4, что позволяет рассматривать этот транскрипционный фактор в качестве регулятора процессов возбудимости нейронов. В других работах сообщается о снижении экспрессии гена *Arc*, белковый продукт которого важен для процессов синаптической пластичности, обработки информации и памяти (Kennedy et al., 2016), а также гена *Wnt7b*, который рассматривается как ключевая мишень TCF4 в регуляции миграции нейрональных клеток-предшественников во время развития зубчатой извилины гиппокампа (Wang et al., 2020) (см. рис. 2).

Несколько исследований демонстрируют, что для мышей с мутациями *Tcf4* характерны возрастание экспрессии генов, связанных с пролиферацией клеток-предшественников нейронов, и подавление экспрессии генов, вовлеченных в нейрональную дифференцировку и миграцию (Li H. et al., 2019), нейрогенез и созревание нейронов (Mesman et al., 2020). B.D.N. Phan с коллегами (2020) сообщают также о нарушении паттерна экспрессии генов, характерного для олигодендроцитов, в частности генов, вовлеченных в критически важный для обеспечения нормальной функции данного типа клеток процесс миелинизации (см. рис. 2).

Таким образом, проведенные исследования позволяют утверждать, что TCF4 имеет критическое значение для развития и функционирования мозга, и предлагают потенциальные мишени, регулируемые этим транскрипци-

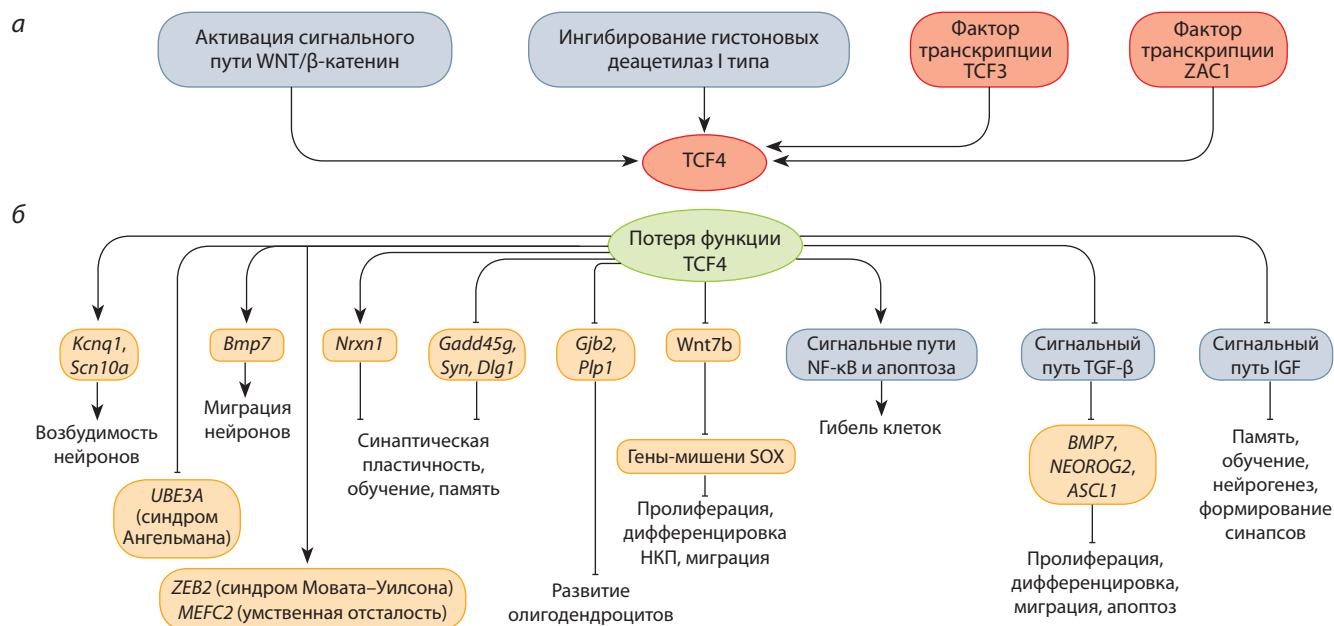


Рис. 2. Вышестоящая регуляция TCF4 и его потенциальные молекулярные мишени.

а – вышестоящая регуляция TCF4; **б** – молекулярные пути и потенциальные гены-мишени, регулируемые TCF4. НКП – нейрональные клетки-предшественники. Стрелки с заостренными концами – активация, с тупыми – ингибирование.

онным фактором. Однако животные модельные системы имеют ряд недостатков, связанных с ограничениями экстраполяции результатов, полученных в подобных моделях, на человека. К примеру, известно, что гаплонедостаточность TCF4 у пациентов с СПХ приводит к развитию клинической картины, тогда как мыши, гетерозиготные по мутациям *Tcf4* (*wt/Tcf4*), как правило, демонстрируют более мягкие фенотипы (Thaxton et al., 2018; Li H. et al., 2019; Mesman et al., 2020; Wang et al., 2020). По-видимому, эти различия обусловлены существенными отличиями между строением и развитием мозга грызунов и человека, которые не должны игнорироваться. Это обстоятельство диктует необходимость проведения исследований на нервных клетках человека.

В работе (Papes et al., 2022) фибробласты, полученные от пациентов с СПХ, были репрограммированы в ИПСК с последующей дифференцировкой в нейрональные клетки-предшественники, нейроны и органоиды головного мозга. Авторы показали, что нейрональные клетки-предшественники с мутациями в *TCF4* характеризуются сниженной пролиферацией и нарушением процесса дифференцировки в нейроны, а органоиды головного мозга – аномальным клеточным составом и размерами (Papes et al., 2022). На основании результатов РНК-секвенирования авторы предполагают, что потеря функции TCF4 приводит к нарушениям сигнального пути Wnt и, как следствие, к снижению экспрессии генов-мишеней SOX, что в конечном итоге снижает пролиферацию клеток-предшественников (Papes et al., 2022). Восстановление экспрессии *TCF4* или фармакологическая коррекция нарушений сигнального пути Wnt способствует частичной коррекции aberrантных фенотипов. Полученные результаты указывают на возможные терапевтические стратегии генетических нарушений, связанных с *TCF4*.

В литературе описано несколько экспериментов, моделирующих нарушения функции TCF4 с использованием SH-SY5Y, интересных с точки зрения понимания молекулярных механизмов, регулируемых этим транскрипционным фактором. Микроматричный анализ транскрипционного профиля, проведенный в клеточной линии SH-SY5Y на фоне нокаута *TCF4*, позволил выявить ДЭГ, вовлеченные в сигнальный путь TGFβ, эпителиально-мезенхимальный переход, нейрональную дифференцировку и апоптоз (Forrest et al., 2013). При этом наиболее выраженной дифференциальной экспрессией характеризовались гены, кодирующие транскрипционные факторы EMT, SNAI2 и DEC1, а также proneйральные гены *NEUROG2* и *ASCL1* и гены, связанные с умственной отсталостью, такие как *UBE3A* (синдром Ангельмана), *ZEB2* (синдром Мовата-Уилсона). Полученные данные свидетельствуют о том, что TCF4 регулирует ряд молекулярных путей, связанных с дифференцировкой и выживанием нервных клеток, а также клинически значимых для патогенеза умственной отсталости генов.

В другом исследовании (Xia et al., 2018) был проведен анализ ДНК-белковых взаимодействий с помощью технологии ChIP-seq в клетках SH-SY5Y, чтобы идентифицировать сайты связывания TCF4 по всему геному. Такой подход позволил выявить более 10000 сайтов связывания, которые могут быть отнесены к более чем 5500 генам. Анализ обогащения потенциальных генов-мишеней выявил пути, связанные с развитием нейронов, а также перекрывания с генами, посмертно гипохеэкспрессирующимися в мозге пациентов с шизофренией. Эта информация в очередной раз подчеркивает важность TCF4 для развития и функционирования мозга и указывает на существование общих для СПХ и шизофрении патогенетических молекулярных путей (Xia et al., 2018).

Таким образом, исследования, проведенные на животных моделях СПХ, выявили множество фенотипов, дающих важную биологическую информацию об этом заболевании. Описанные фенотипы наблюдаются на протяжении всей жизни, начиная с нарушений в развитии коры головного мозга, дифференцировки и созревания нервных клеток и заканчивая нарушениями процессов возбудимости нейронов, синаптической пластичности и поведенческих функций у взрослых животных. Несмотря на то что эксперименты с использованием микроматричного анализа транскрипционного профиля и РНК-секвенирования не указывают на прямые гены-мишени TCF4, они подчеркивают важную роль этого транскрипционного фактора в процессах нейrogenеза и демонстрируют крупномасштабную картину генных сетей, потенциально находящихся под влиянием TCF4. Понимание молекулярных путей и выявление генов-мишеней, регулируемых TCF4, важно не только с фундаментальной точки зрения, но имеет также решающее значение для понимания патогенеза ассоциированных с данным геном заболеваний и поиска потенциальных терапевтических мишеней.

Возможные пути терапии синдрома Питта–Хопкинса

Пациенты с синдромом Питта–Хопкинса нуждаются в медицинской помощи на протяжении всей жизни, однако современные подходы к терапии заболевания направлены на симптоматическое лечение. Несмотря на то что эффективного способа лечения СПХ не существует, продолжают исследования, направленные на понимание молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания и поиск потенциальных терапевтических мишеней. К настоящему времени в доклинических исследованиях на мышинных моделях СПХ было проверено несколько потенциальных терапевтических подходов. Первый связан с коррекцией транскрипционной активности генов с помощью ингибиторов деацетилаз гистонов, использование которых связывают с улучшением памяти и обучаемости. Введение ингибитора деацетилаз гистонов SANA мышам с гетерозиготными мутациями *Tcf4* (делеция экзона, кодирующего bHLH-домен) приводило к улучшению когнитивных функций и памяти (Kennedy et al., 2016). В других работах в качестве терапевтической мишени выбран натриевый потенциал-зависимый канал NaV1.8, кодируемый геном *SCN10A*. Нарушение функции TCF4 приводит к эктопической сверхэкспрессии *Scn10a*, а фармакологическое ингибирование NaV1.8 в мышинных моделях СПХ эффективно в отношении восстановления некоторых физиологических и поведенческих функций (Ekins et al., 2020; Cleary et al., 2021; Martinowich et al., 2022). В частности, S. Ekins с коллегами использовали в качестве ингибитора NaV1.8 препарат никардипин, одобренный управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) и применяемый в кардиологии (Ekins et al., 2020). Существуют и другие селективные ингибиторы NaV1.8, безопасность которых для человека доказана в клинических исследованиях (Hijma et al., 2021, 2022). С учетом данных фактов тестирование антагонистов NaV1.8 для терапии СПХ имеет значительный потенциал.

Обсуждаемые стратегии выбирают в качестве терапевтических мишеней либо вышестоящие регуляторы активности TCF4, либо нижестоящие гены-мишени этого транскрипционного фактора. Несмотря на успехи перечисленных подходов в животных моделях, они имеют некоторые ограничения. Воздействие на вышестоящие регуляторы TCF4, вероятно, не будет обладать достаточной специфичностью и повлечет за собой нежелательные побочные реакции, возникающие из-за нецелевых транскрипционных эффектов. Ограничения второго подхода связаны с тем, что TCF4 регулирует экспрессию сотен или тысяч других генов (Forrest et al., 2013; Hill et al., 2017; Xia et al., 2018; Torshizi et al., 2019), что в значительной степени усложняет поиск ключевых генов-модификаторов транскрипции и коррекцию их уровня экспрессии.

Поскольку основная причина заболевания связана с потерей функции *TCF4*, можно предположить, что восстановление экспрессии гена с помощью антисмысловых олигонуклеотидов или генотерапии окажется наиболее эффективным способом лечения. Однако с учетом того, что пик экспрессии *TCF4* у человека приходится на пренатальный период, после чего снижается до базального уровня, который поддерживается на протяжении всей жизни (Rannals et al., 2016; Phan et al., 2020), возникает вопрос о возможности восстановления физиологических и поведенческих функций пациентов с СПХ в результате нормализации экспрессии данного гена в постнатальном периоде. Помимо того, остается неясным, до какой степени необходимо повышать экспрессию *TCF4*. Регулирование дозы гена чрезвычайно важно, поскольку заболевание может развиваться как из-за слишком низкого, так и из-за слишком высокого уровня экспрессии. Патогенные варианты в *TCF4*, приводящие к гаплонедостаточности, могут вызывать нарушения нервного развития, в то время как полиморфные варианты, локализованные в некодирующих регионах гена, приводят к сверхэкспрессии и, по-видимому, связаны с шизофренией.

В недавнем исследовании Н. Kim с коллегами (2022), проведенном с использованием мышинной модели СПХ, было показано, что развитие фенотипов, характерных для данного синдрома, можно предотвратить или частично скорректировать путем нормализации экспрессии *Tcf4*, причем степень эффективности терапевтического вмешательства зависит от времени воздействия и его специфичности в отношении типа клеток. Панклеточное восстановление экспрессии *Tcf4* в эмбриональном периоде полностью предотвращало развитие фенотипов, характерных для СПХ. Селективное восстановление экспрессии гена в возбуждающих или тормозных нейронах в эмбриональном периоде приводило к восстановлению ряда поведенческих функций. Наконец, постнатальное восстановление экспрессии *Tcf4* с помощью аденоассоциированных вирусных векторов в нейронах снижало тревожно-подобное поведение, стимулировало активность, врожденное поведение и способствовало улучшению памяти. Кроме того, благодаря этому подходу частично восстанавливались показатели ЭЭГ и корректировались уровни экспрессии ряда генов-мишеней *Tcf4* (Kim et al., 2022).

Генная терапия на основе вирусных векторов имеет большие перспективы в части лечения заболеваний, кото-

рые ранее считались неизлечимыми. Согласно базе Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, на март 2023 г. наиболее часто в клинических исследованиях использовались векторы на основе аденовирусов, ретровирусов, лентивирусов и аденоассоциированных вирусов (<https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>; дата обращения 29.06.2024). Использование каждой векторной системы на основе вирусов имеет преимущества и нежелательные эффекты. К последним можно отнести развитие иммунного ответа, цитотоксичность, риски геномной интеграции, а также риски, связанные с возникновением *de novo* репликативно-компетентных вирусов (Ertl, 2022; Leikas et al., 2023; Lundstrom, 2023).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что генотерапевтические подходы к восстановлению экспрессии *TCF4* могут быть эффективны для пациентов с СПХ. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования, позволяющие определить, в какой степени восстановление экспрессии *Tcf4* в разные периоды онтогенеза может помочь скорректировать нарушение поведенческих и физиологических функций. Результаты подобных работ могут пролить свет на понимание эффективности терапии для разных возрастных групп пациентов с СПХ. Кроме того, потенциальные методы лечения с помощью коррекции уровня экспрессии *TCF4* должны будут обеспечить соответствующее биораспределение кодируемого белка, поскольку проведенные исследования показывают, что восстановление активности гена лишь в определенных клетках и структурах головного мозга может приводить к нормализации ряда поведенческих и физиологических функций у лабораторных животных (Kim et al., 2022). Один из основных плюсов генной терапии СПХ заключается в том, что данный подход не требует понимания молекулярных механизмов патогенеза, так как воздействует на основную причину заболевания — нарушение или потерю функции TCF4. Тем не менее, если подходы генной терапии для человека в постнатальном периоде окажутся неэффективными или не будут реализованы внутриутробно, по-видимому, основной фокус исследований необходимо будет сместить на поиск стратегий лечения, воздействующих на регулируемые TCF4 молекулярные пути и нижестоящие гены-мишени.

Заключение

К настоящему времени накоплено значительное количество экспериментальных данных, демонстрирующих важную роль транскрипционного фактора TCF4 в развитии и функционировании нервной системы. Показано, что нарушения структуры и функций *TCF4* приводят к развитию синдрома Питта–Хопкинса, а варианты в гене ассоциированы с рядом психических расстройств. Тем не менее молекулярные механизмы патогенеза подобных состояний по-прежнему остаются неизученными, а наши знания о вышестоящей регуляции TCF4 и его нижестоящих генах-мишенях ограничены. Более того, на сегодняшний день не хватает сведений о динамической экспрессии и функции *TCF4* в ходе онтогенеза. Неясно также, каким образом изменяется активность кодируемого транскрипционного фактора в зависимости от партнеров по димеризации.

Принимая во внимание широкий паттерн экспрессии *TFC4*, а также его участие в развитии нервной системы, можно предположить, что патогенные варианты, затрагивающие данный ген, могут быть связаны и с другими патологическими состояниями. В поддержку этой идеи свидетельствуют работы по анализу транскрипционного профиля генов на фоне потери функции TCF4, а также исследования ДНК-белковых взаимодействий с использованием технологии ChIP-Seq, указывающие на то, что в патогенезе СПХ и некоторых психических расстройств, по-видимому, задействованы общие патогенетические пути (Xia et al., 2018; Phan et al., 2020).

Несмотря на то что многие аспекты функционирования TCF4 еще предстоит изучить, очевидно, что данный транскрипционный фактор является одним из ключевых белков, ответственных за обучение, память, речевые контакты и коммуникативные функции при психических расстройствах. Дальнейшее изучение TCF4, выявление молекулярных путей и генов-мишеней, регулируемых этим транскрипционным фактором, имеют решающее значение для понимания патогенеза ассоциированных с *TCF4* заболеваний, а также поиска потенциальных стратегий терапии СПХ и, возможно, ряда социально значимых заболеваний, таких как шизофрения, биполярное расстройство и некоторые другие.

Список литературы / References

- Папаян С.С., Астахов С.Ю., Назаров В.Д., Лапин С.В., Новиков С.А., Рикс И.А., Аникина Л.К., Довыденко К.С. Экспансия тринуклеотидных CTG-повторов в гене *TCF4* как маркер эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса. *Офтальмол. ведомости*. 2019;12(2):11-18. DOI 10.17816/OV2019211-18
- [Papanyan S.S., Astakhov S.Yu., Nazarov V.D., Lapin S.V., Novikov S.A., Riks I.A., Anikina L.K., Dovydenko K.S. Expansion of trinucleotide CTG repeats in the *TCF4* gene as a marker of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Ophthalmology Journal*. 2019;12(2): 11-18. DOI 10.17816/OV2019211-18]
- Afshari N.A., Igo R.P., Morris N.J., Stambolian D., Sharma S., Pulagam V.L., Dunn S., Stamler J.F., Truitt B.J., Rimmler J., Kuot A., Croasdale C.R., Qin X., Burdon K.P., Riazuddin S.A., Mills R., Klebe S., Minear M.A., Zhao J., Balajonda E., Rosenwasser G.O., Baratz K.H., Mootha V.V., Patel S.V., Gregory S.G., Bailey-Wilson J.E., Price M.O., Price F.W., Craig J.E., Fingert J.H., Gottsch J.D., Aldave A.J., Klintworth G.K., Lass J.H., Li Y.J., Iyengar S.K. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Nat. Commun*. 2017;8:14898. DOI 10.1038/NCOMMS14898
- Amiel J., Rio M., De Pontual L., Redon R., Malan V., Boddaert N., Plouin P., Carter N.P., Lyonnet S., Munnich A., Colleaux L. Mutations in *TCF4*, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am. J. Hum. Genet*. 2007;80(5):988-993. DOI 10.1086/515582
- Baratz K.H., Tosakulwong N., Ryu E., Brown W.L., Branham K., Chen W., Tran K.D., Schmid-Kubista K.E., Heckenlively J.R., Swaroop A., Abecasis G., Bailey K.R., Edwards A.O. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N. Engl. J. Med*. 2010;363(11):1016-1024. DOI 10.1056/NEJMoa1007064
- Bedeschi M.F., Marangi G., Calvello M.R., Ricciardi S., Leone F.P.C., Baccarin M., Gueneri S., Orteschi D., Murdolo M., Lattante S., Frangella S., Keena B., Harr M.H., Zackai E., Zollino M. Impairment of different protein domains causes variable clinical presentation within Pitt-Hopkins syndrome and suggests intragenic molecular syndromology of TCF4. *Eur. J. Med. Genet*. 2017;60(11):565-571. DOI 10.1016/J.EJMG.2017.08.004

- Bocharova A.V., Stepanov V.A., Marusin A.V., Kharkov V.N., Vagaitseva K.V., Fedorenko O.Y., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A. Association study of genetic markers of schizophrenia and its cognitive endophenotypes. *Russ. J. Genet.* 2017;53(1):139-146. DOI 10.1134/S1022795417010033
- Brockschmidt A., Todt U., Ryu S., Hoischen A., Landwehr C., Birnbaum S., Frenck W., Radlwimmer B., Lichter P., Engels H., Driever W., Kubisch C., Weber R.G. Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor *TCF4*. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(12):1488-1494. DOI 10.1093/HMG/DDM099
- Chen H.Y., Bohlen J.F., Maher B.J. Molecular and cellular function of transcription factor 4 in Pitt-Hopkins syndrome. *Dev. Neurosci.* 2021;43(3-4):159-167. DOI 10.1159/000516666
- Chen T., Wu Q., Zhang Y., Lu T., Yue W., Zhang D. *Tcf4* controls neuronal migration of the cerebral cortex through regulation of *Bmp7*. *Front. Mol. Neurosci.* 2016;9:94. DOI 10.3389/FNMOL.2016.00094
- Cleary C.M., James S., Maher B.J., Mulkey D.K. Disordered breathing in a Pitt-Hopkins syndrome model involves *Phox2b*-expressing parafacial neurons and aberrant *Nav1.8* expression. *Nat. Commun.* 2021;12(1):1-15. DOI 10.1038/s41467-021-26263-2
- D'Rozario M., Zhang T., Waddell E.A., Zhang Y., Sahin C., Sharoni M., Hu T., Nayal M., Kutty K., Liebl F., Hu W., Marenda D.R. Type I bHLH proteins Daughterless and TCF4 restrict neurite branching and synapse formation by repressing Neurexin in post-mitotic neurons. *Cell Rep.* 2016;15(2):386. DOI 10.1016/J.CELREP.2016.03.034
- Du J., Aleff R.A., Soragni E., Kalari K., Nie J., Tang X., Davila J., Kocher J.P., Patel S.V., Gottesfeld J.M., Baratz K.H., Wieben E.D. RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. *J. Biol. Chem.* 2015;290(10):5979-5990. DOI 10.1074/JBC.M114.621607
- Ekins S., Puhl A.C., Davidow A. Repurposing the dihydropyridine calcium channel inhibitor nifedipine as a *Nav1.8* inhibitor *in vivo* for Pitt Hopkins syndrome. *Pharm. Res.* 2020;37(7):127. DOI 10.1007/S11095-020-02853-5
- Ellinghaus D., Folseraas T., Holm K., Ellinghaus E., Melum E., Balschun T., Laerdahl J.K., Shiryayev A., Gotthardt D.N., Weismüller T.J., Schramm C., Wittig M., Bergquist A., Björnsson E., Marschall H.U., Vatn M., Teufel A., Rust C., Gieger C., Wichmann H.E., Runz H., Sterneck M., Rupp C., Braun F., Weersma R.K., Wijmenga C., Ponsioen C.Y., Mathew C.G., Rutgeerts P., Vermeire S., Schrupf E., Hov J.R., Manns M.P., Boberg K.M., Schreiber S., Franke A., Karlsen T.H. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis identifies risk loci at GPR35 and TCF4. *Hepatology.* 2013;58(3):1074-1083. DOI 10.1002/HEP.25977
- Ertl H.C.J. Immunogenicity and toxicity of AAV gene therapy. *Front. Immunol.* 2022;13:975803. DOI 10.3389/FIMMU.2022.975803
- Fautsch M.P., Wieben E.D., Baratz K.H., Bhattacharyya N., Sadan A.N., Hafford-Tear N.J., Tuft S.J., Davidson A.E. TCF4-mediated Fuchs endothelial corneal dystrophy: insights into a common trinucleotide repeat-associated disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 2021;81:100883. DOI 10.1016/J.PRETEYERES.2020.100883
- Forrest M.P., Waite A.J., Martin-Rendon E., Blake D.J. Knockdown of human TCF4 affects multiple signaling pathways involved in cell survival, epithelial to mesenchymal transition and neuronal differentiation. *PLoS One.* 2013;8(8):e73169. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0073169
- Forrest M.P., Hill M.J., Kavanagh D.H., Tansey K.E., Waite A.J., Blake D.J. The psychiatric risk gene transcription factor 4 (TCF4) regulates neurodevelopmental pathways associated with schizophrenia, autism, and intellectual disability. *Schizophr. Bull.* 2018;44(5):1100-1110. DOI 10.1093/SCHBUL/SBX164
- Gelernter J., Sun N., Polimanti R., Pietrzak R., Levey D.F., Bryois J., Lu Q., Hu Y., Li B., Radhakrishnan K., Aslan M., Cheung K.H., Li Y., Rajeevan N., Sayward F., Harrington K., Chen Q., Cho K., Pyarajan S., Sullivan P.F., Quaden R., Shi Y., Hunter-Zinck H., Gatziano J.M., Concato J., Zhao H., Stein M.B. Genome-wide association study of post-traumatic stress disorder reexperiencing symptoms in >165,000 US veterans. *Nat. Neurosci.* 2019;22(9):1394-1401. DOI 10.1038/s41593-019-0447-7
- Hennig K.M., Fass D.M., Zhao W.-N., Sheridan S.D., Fu T., Erdin S., Stortchevoi A., Lucente D., Cody J.D., Sweetser D., Gusella J.F., Talkowski M.E., Haggarty S.J. WNT/ β -catenin pathway and epigenetic mechanisms regulate the Pitt-Hopkins syndrome and schizophrenia risk gene *TCF4*. *Mol. Neuropsychiatry.* 2017;3(1):53-71. DOI 10.1159/000475666
- Hijma H.J., Siebenga P.S., De Kam M.L., Groeneveld G.J. A phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study to evaluate the pharmacodynamic effects of VX-150, a highly selective *Nav1.8* inhibitor, in healthy male adults. *Pain Med.* 2021;22(8):1814-1826. DOI 10.1093/PM/PNAB032
- Hijma H.J., van Brummelen E.M.J., Siebenga P.S., Groeneveld G.J. A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, single- and multiple dose escalation study evaluating the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of VX-128, a highly selective *Nav1.8* inhibitor, in healthy adults. *Clin. Transl. Sci.* 2022;15(4):981-993. DOI 10.1111/CTS.13215
- Hill M.J., Killick R., Navarrete K., Maruszak A., McLaughlin G.M., Williams B.P., Bray N.J. Knockdown of the schizophrenia susceptibility gene *TCF4* alters gene expression and proliferation of progenitor cells from the developing human neocortex. *J. Psychiatry Neurosci.* 2017;42(3):181-188. DOI 10.1503/JPN.160073
- Imayoshi I., Kageyama R. bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron.* 2014;82(1):9-23. DOI 10.1016/J.NEURON.2014.03.018
- Kennedy A.J., Rahn E.J., Paulukaitis B.S., Savell K.E., Kordasiewicz H.B., Wang J., Lewis J.W., Posey J., Strange S.K., Guzman-Karlsson M.C., Phillips S.E., Decker K., Motley S.T., Swayze E.E., Ecker D.J., Michael T.P., Day J.J., Sweatt J.D. *Tcf4* regulates synaptic plasticity, DNA methylation, and memory function. *Cell Rep.* 2016;16(10):2666-2685. DOI 10.1016/J.CELREP.2016.08.004
- Kim H., Gao E.B., Draper A., Berens N.C., Vihma H., Zhang X., Higashi-Howard A., Ritola K.D., Simon J.M., Kennedy A.J., Philpot B.D. Rescue of behavioral and electrophysiological phenotypes in a Pitt-Hopkins syndrome mouse model by genetic restoration of *Tcf4* expression. *eLife.* 2022;11:e72290. DOI 10.7554/ELIFE.72290
- Leikas A.J., Ylä-Herttuala S., Hartikainen J.E.K. Adenoviral gene therapy vectors in clinical use – basic aspects with a special reference to replication-competent adenovirus formation and its impact on clinical safety. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(22):16519. DOI 10.3390/IJMS242216519
- Li H., Zhu Y., Morozov Y.M., Chen X., Page S.C., Rannals M.D., Maher B.J., Rakic P. Disruption of TCF4 regulatory networks leads to abnormal cortical development and mental disabilities. *Mol. Psychiatry.* 2019;24(8):1235-1246. DOI 10.1038/S41380-019-0353-0
- Li M., Santpere G., Kawasawa Y.I., Evgrafov O.V., Gulden F.O., Pochareddy S., Sunkin S.M., Li Z., Shin Y., Zhu Y., ... State M.W., Sanders S.J., Sullivan P.F., Gerstein M.B., Lein E.S., Knowles J.A., Sestan N. Integrative functional genomic analysis of human brain development and neuropsychiatric risks. *Science.* 2018;362(6420):eaat7615. DOI 10.1126/SCIENCE.AAT7615
- Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy: where do we stand in 2023? *Viruses.* 2023;15(3):698. DOI 10.3390/V15030698
- Martinowich K., Das D., Sripathy S.R., Mai Y., Kenney R.F., Maher B.J. Evaluation of *Nav1.8* as a therapeutic target for Pitt Hopkins Syndrome. *Mol. Psychiatry.* 2022;28(1):76-82. DOI 10.1038/s41380-022-01811-4
- Mesman S., Bakker R., Smidt M.P. *Tcf4* is required for correct brain development during embryogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 2020;106:103502. DOI 10.1016/J.MCN.2020.103502
- Papes F., Camargo A.P., de Souza J.S., Carvalho V.M.A., Szeto R.A., LaMontagne E., Teixeira J.R., Avansini S.H., Sánchez-Sánchez S.M., Nakahara T.S., Santo C.N., Wu W., Yao H., Araújo B.M.P., Vel-





- ho P.E.N.F., Haddad G.G., Muotri A.R. Transcription factor 4 loss-of-function is associated with deficits in progenitor proliferation and cortical neuron content. *Nat. Commun.* 2022;13(1):2387. DOI 10.1038/s41467-022-29942-w
- Phan B.D.N., Bohlen J.F., Davis B.A., Ye Z., Chen H.Y., Mayfield B., Sripathy S.R., Cerceo Page S., Campbell M.N., Smith H.L., Gallop D., Kim H., Thaxton C.L., Simon J.M., Burke E.E., Shin J.H., Kennedy A.J., Sweatt J.D., Philpot B.D., Jaffe A.E., Maher B.J. A myelin-related transcriptomic profile is shared by Pitt-Hopkins syndrome models and human autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* 2020;23(3):375-385. DOI 10.1038/S41593-019-0578-X
- Rannals M.D.D., Hamersky G.R.R., Page S.C.C., Campbell M.N.N., Briley A., Gallo R.A.A., Phan B.D.N., Hyde T.M.M., Kleinman J.E.E., Shin J.H.H., Jaffe A.E.E., Weinberger D.R.R., Maher B.J.J. Psychiatric Risk Gene Transcription Factor 4 regulates intrinsic excitability of prefrontal neurons via repression of SCN10a and KCNQ1. *Neuron.* 2016;90(1):43-55. DOI 10.1016/J.NEURON.2016.02.021
- Ripke S., Sanders A.R., Kendler K.S., Levinson D.F., Sklar P., Holmans P.A., Lin D.Y., Duan J., Ophoff R.A., Andreassen O.A., ... Williams N.M., Wormley B., Zeng C., Sullivan P.F., O'Donovan M.C., Daly M.J., Gejman P.V. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat. Genet.* 2011;43(10):969-976. DOI 10.1038/ng.940
- Rosenfeld J.A., Leppig K., Ballif B.C., Thiese H., Erdie-Lalena C., Bawle E., Sastry S., Spence J.E., Bandholz A., Surti U., Zonana J., Keller K., Meschino W., Bejjani B.A., Torchia B.S., Shaffer L.G. Genotype-phenotype analysis of *TCF4* mutations causing Pitt-Hopkins syndrome shows increased seizure activity with missense mutations. *Genet. Med.* 2009;11(11):797-805. DOI 10.1097/GIM.0B013E3181BD38A9
- Schmidt-Edelkraut U., Daniel G., Hoffmann A., Spengler D. Zc1 regulates cell cycle arrest in neuronal progenitors via Tcf4. *Mol. Cell Biol.* 2014;34(6):1020. DOI 10.1128/MCB.01195-13
- Schoof M., Hellwig M., Harrison L., Holdhof D., Lauffer M.C., Nielsen J., Virdi S., Indenbirken D., Schüller U. The basic helix-loop-helix transcription factor TCF4 impacts brain architecture as well as neuronal morphology and differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 2020;51(11):2219-2235. DOI 10.1111/EJN.14674
- Sepp M., Kannike K., Eesmaa A., Urb M., Timmusk T. Functional diversity of human basic helix-loop-helix transcription factor TCF4 isoforms generated by alternative 5' exon usage and splicing. *PLoS One.* 2011;6(7):e22138. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0022138
- Sepp M., Pruunsild P., Timmusk T. Pitt-Hopkins syndrome-associated mutations in *TCF4* lead to variable impairment of the transcription factor function ranging from hypomorphic to dominant-negative effects. *Hum. Mol. Genet.* 2012;21(13):2873-2888. DOI 10.1093/HMG/DDS112
- Sepp M., Vihma H., Nurm K., Urb M., Page S.C., Roots K., Hark A., Maher B.J., Pruunsild P., Timmusk T. The intellectual disability and schizophrenia associated transcription factor TCF4 is regulated by neuronal activity and protein kinase A. *J. Neurosci.* 2017;37(43):10516-10527. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1151-17.2017
- Smoller J.W., Kendler K.K., Craddock N., Lee P.H., Neale B.M., Nurnberger J.N., Ripke S., Santangelo S., Sullivan P.S., Neale B.N., Purcell S., Anney R., Buitelaar J., Fanous A., Faraone S.F., Hoogendijk W., Lesch K.P., Levinson D.L., Perlis R.P., Rietschel M., Riley B., Sonuga-Barke E., Schachar R., Schulze T.G., Thapar A., Smoller J.S., Neale M., Perlis R., Bender P., Cichon S., Daly M.D., Kelsoe J., Lehner T., Levinson D., O'Donovan M., Gejman P., Sebat J., Sklar P., Devlin B., Sullivan P., O'Donovan Michael. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet.* 2013;381(9875):1371-1379. DOI 10.1016/S0140-6736(12)62129-1
- Stefansson H., Ophoff R.A., Steinberg S., Andreassen O.A., Cichon S., Rujescu D., Werge T., Pietiläinen O.P.H., Mors O., Mortensen P.B., ... Van Os J., Wiersma D., Bruggeman R., Cahn W., De Haan L., Krabbendam L., Myin-Germeys I. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature.* 2009;460(7256):744-747. DOI 10.1038/NATURE08186
- Steinberg S., de Jong S., Andreassen O.A., Werge T., Børglum A.D., Mors O., Mortensen P.B., Gustafsson O., Costas J., Pietiläinen O.P.H., ... Collier D.A., St Clair D., Rietschel M., Cichon S., Stefansson H., Rujescu D., Stefansson K. Common variants at *VRK2* and *TCF4* conferring risk of schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20(20):4076-4081. DOI 10.1093/HMG/DDR325
- Tamberg L., Jaago M., Säälik K., Sirp A., Tuvikene J., Shubina A., Kiir C.S., Nurm K., Sepp M., Timmusk T., Palgi M. Daughterless, the *Drosophila* orthologue of TCF4, is required for associative learning and maintenance of the synaptic proteome. *DMM: Dis. Model. Mech.* 2020;13(7):dmm042747. DOI 10.1242/dmm.042747
- Teixeira J.R., Szeto R.A., Carvalho V.M.A., Muotri A.R., Papes F. Transcription factor 4 and its association with psychiatric disorders. *Transl. Psychiatry.* 2021;11(1):19. DOI 10.1038/s41398-020-01138-0
- Thaxton C., Kloth A.D., Clark E.P., Moy S.S., Chitwood R.A., Philpot B.D. Common pathophysiology in multiple mouse models of Pitt-Hopkins syndrome. *J. Neurosci.* 2018;38(4):918-936. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1305-17.2017
- Torshizi A.D., Armoskus C., Zhang H., Forrest M.P., Zhang S., Souzaia T., Evgrafov O.V., Knowles J.A., Duan J., Wang K. Deconvolution of transcriptional networks identifies TCF4 as a master regulator in schizophrenia. *Sci. Adv.* 2019;5(9):eaau4139. DOI 10.1126/SCIADV.AAU4139
- Wang Y., Lu Z., Zhang Yilan, Cai Y., Yun D., Tang T., Cai Z., Wang C., Zhang Yandong, Fang F., Yang Z., Behnisch T., Xie Y. Transcription factor 4 safeguards hippocampal dentate gyrus development by regulating neural progenitor migration. *Cereb. Cortex.* 2020;30(5):3102-3115. DOI 10.1093/CERCOR/BHZ297
- Wedel M., Fröb F., Elsesser O., Wittmann M.T., Lie D.C., Reis A., Wegner M. Transcription factor Tcf4 is the preferred heterodimerization partner for Olig2 in oligodendrocytes and required for differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(9):4839-4857. DOI 10.1093/NAR/GKAA218
- Wittmann M.T., Häberle B.M. Linking the neuropsychiatric disease gene *TCF4* to neuronal activity-dependent regulatory networks. *J. Neurosci.* 2018;38(11):2653. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3475-17.2018
- Wray N.R., Ripke S., Mattheisen M., Trzaskowski M., Byrne E.M., Abdellaoui A., Adams M.J., Agerbo E., Air T.M., Andlauer T.M.F., ... Werge T., Winslow A.R., Lewis C.M., Levinson D.F., Breen G., Børglum A.D., Sullivan P.F. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat. Genet.* 2018;50(5):668-681. DOI 10.1038/s41588-018-0090-3
- Xia H., Jahr F.M., Kim N.K., Xie L., Shabalin A.A., Bryois J., Sweet D.H., Kronfol M.M., Palasuberniam P., McRae M.P., Riley B.P., Sullivan P.F., Van Den Oord E.J., McClay J.L. Building a schizophrenia genetic network: transcription factor 4 regulates genes involved in neuronal development and schizophrenia risk. *Hum. Mol. Genet.* 2018;27(18):3246-3256. DOI 10.1093/HMG/DDY222
- Zweier C., Peippo M.M., Hoyer J., Sousa S., Bottani A., Clayton-Smith J., Reardon W., Saraiva J., Cabral A., Göhring I., Devriendt K., De Ravel T., Bijlsma E.K., Hennekam R.C.M., Orrico A., Cohen M., Dreweke A., Reis A., Nurnberg P., Rauch A. Haploinsufficiency of *TCF4* causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* 2007;80(5):994-1001. DOI 10.1086/515583

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.01.2024. После доработки 30.06.2024. Принята к публикации 23.07.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-86

Распространенность микроделений AZFc региона Y-хромосомы и влияние на сперматогенез у российских мужчин из общей популяции

Л.В. Осадчук , Г.В. Васильев , М.К. Иванов², М.А. Прасолова^{1, 2}, М.А. Клещев , А.В. Осадчук 

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

² АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

 losadch@bionet.nsc.ru

Аннотация. Y-хромосома содержит набор генов, имеющих тестис-специфическую экспрессию, ответственных за развитие яичек и сперматогенез, и является наиболее важной мишенью в поиске генетических причин мужского бесплодия. Большинство из этих генов расположены в локусе «фактора азооспермии» AZF (регионы AZFa, AZFb и AZFc) на длинном плече Y-хромосомы. Микроделеции Y-хромосомы, приводящие к удалению всего локуса AZF, а также одного или нескольких регионов (полные делеции), являются одной из ведущих причин нарушения сперматогенеза и бесплодия, однако роль частичных AZFc-делеций (gr/gr, b2/b3, b1/b3) в нарушении сперматогенеза не ясна, а влияние на сперматогенез варьирует между популяциями. Цель настоящего исследования состояла в оценке частоты различных типов AZFc-микроделений и поиске ассоциаций с параметрами сперматогенеза у мужчин славянской этнической группы из общей российской популяции ($n = 700$, средний возраст 25.8 года). Для выявления AZF-микроделений анализировали наличие/отсутствие 15 STS-маркеров методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. У всех участников записывали возраст, вес, рост, оценивали объем, концентрацию, общее количество, долю подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов в эякуляте. В исследуемой выборке выявлены 19.9 % (139/700) мужчин с микроделециями AZFc региона, из них 16.7 % (117/700) являлись носителями частичной делеции b2/b3, 3.0 % (21/700) – частичной делеции gr/gr, 0.14 % (1/700) – полной делеции b2/b4. Не обнаружены AZFa и AZFb микроделеции и другие типы AZF-делеций. Суммарная частота всех типов AZFc-делеций, а также каждого типа частичных микроделений b2/b3 и gr/gr не различалась в группах азооспермии, тяжелой олигозооспермии (≤ 5.0 млн/мл), олигозооспермии ($5.0 < KC < 16.0$ млн/мл) и нормальной концентрации сперматозоидов (≥ 16.0 млн/мл). Сравнение спермиологических показателей в группах с различными типами частичных AZFc-делеций и контролем (без делеций) тоже не выявило достоверных различий. Таким образом, частичные AZFc-микроделеции b2/b3 и gr/gr не оказывают существенного влияния на сперматогенез у славянских мужчин. Предполагается, что у славян частичные AZFc-микроделеции b2/b3 и gr/gr фиксированы в Y-гаплогруппе N3 и R1a соответственно, а их негативное влияние на сперматогенез уравнивается другими генетическими факторами. Установленная в нашей работе более высокая частота частичных AZFc-делеций (19.7 %) у славян по сравнению с европейскими популяциями (7.3 %) также может объясняться широким распространением этих Y-гаплогрупп в славянской популяции России.

Ключевые слова: AZFc-микроделеции Y-хромосомы; сперматогенез; мужская фертильность; общая популяция.

Для цитирования: Осадчук Л.В., Васильев Г.В., Иванов М.К., Прасолова М.А., Клещев М.А., Осадчук А.В. Распространенность микроделений AZFc региона Y-хромосомы и влияние на сперматогенез у российских мужчин из общей популяции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):780-791. DOI 10.18699/vjgb-24-86

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания FWNR-2022-0021 «Генофонды населения Сибири, генетические маркеры заболеваний человека и молекулярные основы формирования патологических процессов».

Вклад авторов. ЛВО – оформление базы данных и написание текста статьи; АВО – идея, экспериментальный дизайн исследования, статистический анализ результатов; ГВВ, МКИ, МАП – экспериментальный анализ AZF-делеций; МАК – анализ показателей сперматогенеза.

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

Prevalence of AZFc Y chromosome microdeletions and association with spermatogenesis in Russian men from the general population

L.V. Osadchuk , G.V. Vasiliev , M.K. Ivanov², M.A. Prasolova^{1, 2}, M.A. Kleshchev , A.V. Osadchuk 

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

² Joint Stock Company Vector Best, Novosibirsk region, Russia

 losadch@bionet.nsc.ru

Abstract. The Y chromosome contains a set of genes with testis-specific expression that are responsible for the development of testes and spermatogenesis, and it is the most important target in the search for genetic causes of male infertility. Most of these genes are located in the “azoospermia factor” AZF locus (regions AZFa, AZFb, and AZFc) on the long arm of the Y chromosome. Microdeletions of the Y chromosome, leading to the removal of the entire AZF locus as well as one or more regions (complete deletions), are one of the leading causes of spermatogenesis impairment and infertility. However, the role of partial AZFc deletions (gr/gr, b2/b3, b1/b3) in spermatogenesis failure is unclear, and their impact on spermatogenesis varies between populations. The aim of the present study was to assess the frequency of various types of AZFc microdeletions and to search for associations with spermatogenesis parameters in men of Slavic ethnicity from the general Russian population ($n = 700$, average age 25.8 years). To identify AZF microdeletions, the presence/absence of 15 STS markers was analyzed using multiplex real-time polymerase chain reaction. Age, weight, height, and the volume, concentration, total count, proportion of motile and morphologically normal spermatozoa in the ejaculate were recorded for all participants. In the studied sample, 19.9 % (139/700) of men were found to have AZFc microdeletions, of which 16.7 % (117/700) were carriers of a partial b2/b3 deletion, 3.0 % (21/700) had a partial gr/gr deletion, and 0.14 % (1/700) had a complete b2/b4 deletion. Neither AZFa nor AZFb microdeletions nor other types of AZF deletions were detected. The overall frequency of all types of AZFc deletions, as well as each type of partial microdeletion, b2/b3 and gr/gr, did not differ in the groups of azoospermia, severe oligozoospermia (≤ 5.0 mill/ml), oligozoospermia ($5.0 < SC < 16.0$ mill/ml), and normal sperm concentration (≥ 16.0 mill/ml). Comparison of semen parameters in groups with different types of partial AZFc deletions and the control group (without deletions) also did not reveal significant differences. Thus, partial AZFc microdeletions b2/b3 and gr/gr do not have a significant impact on spermatogenesis in Slavic men. It is suggested that in Slavs, partial AZFc microdeletions b2/b3 and gr/gr are fixed in Y haplogroups N3 and R1a, respectively, and their negative impact on spermatogenesis is balanced by other genetic factors. The higher frequency of partial AZFc deletions (19.7 %) in Slavs compared to European populations (7.3 %) established in our study may be explained by the widespread distribution of these Y haplogroups in the Slavic population of Russia.

Key words: AZFc deletions of the Y chromosome; spermatogenesis; male fertility; general population.

For citation: Osadchuk L.V., Vasiliev G.V., Ivanov M.K., Prasolova M.A., Kleshchev M.A., Osadchuk A.V. Prevalence of AZFc Y chromosome microdeletions and association with spermatogenesis in Russian men from the general population. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):780–791. DOI 10.18699/vjgb-24-86

Введение

Распространенность мужского бесплодия в общей популяции составляет 7–12 % (Krausz et al., 2018; Cioppi et al., 2021), а в Российской Федерации бесплодием страдает 10–15 % супружеских пар в зависимости от региона (Лебедев и др., 2019). Известен целый ряд генетических вариантов, негативно влияющих на мужскую фертильность, который непрерывно пополняется (Cioppi et al., 2021). Y-хромосома – наиболее важная молекулярно-генетическая мишень в поиске генетических причин мужского бесплодия и субфертильности (Krausz, Casamonti, 2017; Colaco, Modi, 2018). Она несет гены, необходимые для нормального развития яичек и их функций, таких как детерминация пола и регуляция сперматогенеза. На Y-хромосоме находится локус AZF и его три региона, AZFa, AZFb и AZFc. Микроделеции Y-хромосомы, приводящие к удалению целых AZF регионов (полные микроделеции), считаются одной из ведущих причин нарушения сперматогенеза и бесплодия после синдрома Клайнфельтера (Krausz, Casamonti, 2017; Krausz et al., 2024). Микроделеции AZF локуса являются мутациями *de novo*, частота полных микроделеций AZF в общей популяции составляет 1:4000, но у мужчин с азооспермией и олигозооспермией она значительно выше и может достигать 14 % (Colaco, Modi, 2018; Cioppi et al., 2021; Deng et al., 2023). Для тестирования микроделеций AZF локуса Y-хромосомы разработаны адекватные диагностические методы, а скрининг полных микроделеций AZFa и AZFb стал обязательной частью рутинного диагностического обследования мужчин с азооспермией и тяжелой олигозооспермией, в то время как AZFc регион остается предметом дискуссии в отношении клинической и диагностической значимости (Krausz et al., 2018). Показанием для тестирования на микроделеции

Y-хромосомы считается концентрация сперматозоидов в эякуляте менее 5 млн/мл или азооспермия, что часто наблюдается у пациентов с бесплодием (Krausz et al., 2018).

Особенностью AZF локуса Y-хромосомы является ампликонная структура и многокопийность его генов. Ампликонные последовательности идентичны более чем на 99 % и организованы в восемь больших палиндромов. Поскольку последовательности палиндромов демонстрируют почти полную симметрию, они склонны образовывать структуры, аналогичные шпилькам, и осуществлять гомологичную рекомбинацию (Kuroda et al., 2020). К наиболее частым типам делеций AZF относятся AZFc (70–80 %), затем AZFa (0.5–9 %), AZFb (1–7 %) и AZFb+c (1–20 %) (Krausz, Casamonti, 2017; Cioppi et al., 2021; Krausz et al., 2024). Полные AZF-делеции, полностью удаляющие один или несколько AZF регионов, вызывают тяжелые нарушения сперматогенеза, приводят к бесплодию и у мужчин с нормозооспермией никогда не встречаются.

AZFa регион содержит два однокопийных гена *USP9Y* и *DDX3Y* и ретровирусные последовательности *HERVYq1* и *HERVYq2*, которые фланкируют AZFa. Между ними может произойти гомологичная рекомбинация, приводящая к полной делеции AZFa, синдрому «только клетки Сертоли» и азооспермии. AZFb регион содержит 32 генных копии и единицы транскрипции. При полной делеции AZFb удаляется сегмент ДНК, включающий все 32 копии генов и единицы транскрипции, что приводит к аресту сперматогенеза и азооспермии. Регионы AZFb и AZFc частично перекрываются, а полная делеция AZFb или AZFb+c ассоциирована с синдромом «только клетки Сертоли» и азооспермией (Kuroda et al., 2020; Cioppi et al., 2021).

Регион AZFc включает в себя 12 генов, каждый из которых представлен переменным количеством копий (в об-

щей сложности 32 единицы транскрипции), экспрессирующихся только в яичках и наиболее часто подвергающихся делециям (Colaco, Modi, 2018; Cioppi et al., 2021; Krausz et al., 2024). Полная делеция AZFc (b2/b4) возникает в результате гомологичной рекомбинации между ампликонами b2 и b4 и характеризуется нарушениями сперматогенеза – от тяжелой олигозооспермии до азооспермии, но в значительной части случаев сопровождается остаточным сперматогенезом (Krausz et al., 2024). AZFc регион содержит семейство генов *DAZ* (deleted in azoospermia), которое является ключевым детерминантом сперматогенеза и состоит из четырех копий (*DAZI–4*). Ген *DAZ* содержит РНК-связывающий домен, что указывает на участие генов этого семейства в трансляции мРНК и, по-видимому, в дифференцировке сперматогенных клеток и мейотическом делении. Копии гена *DAZ* находятся в двух различных кластерах (*DAZI/2* и *DAZ3/4*), а их экспрессия наблюдается на всех стадиях развития мужских половых клеток (Colaco, Modi, 2018). Регион AZFc богат ампликонами, следовательно, предрасположен к ряду перестроек, включая частичные делеции или дупликации, а также делеции с последующей дупликацией, однако их влияние на сперматогенез пока не ясно и активно обсуждается (Krausz, Casamonti, 2017). Степень влияния частичных делеций AZFc региона (наиболее часто встречаются делеции gr/gr, b2/b3, b1/b3) на показатели сперматогенеза сильно варьирует (от нормозооспермии до азооспермии), но они могут быть совместимы с естественным зачатием или успешно преодолеваются вспомогательными репродуктивными технологиями (Bansal et al., 2016a, b).

Частичная делеция gr/gr удаляет почти половину AZFc региона, включая две копии гена *DAZ* (*DAZI/DAZ2* или *DAZ3/DAZ4*) и по одной копии гена *BPY2* и *CDY1*, и представляет собой фактор риска нарушения сперматогенеза (Bansal et al., 2016b; Krausz et al., 2024). Фенотипическая экспрессия делеции gr/gr варьирует от азооспермии до нормальной концентрации сперматозоидов в эякуляте, причина которой пока не ясна. Поскольку за некоторыми делециями gr/gr следуют дупликации, восстанавливающие количество копий гена, то именно количество копий может быть причинным фактором, модулирующим продукцию сперматозоидов. Обнаружены географические и этнические различия в частоте и клиническом проявлении делеции gr/gr, что предполагает влияние генетического бэкграунда (генетического фона) Y-хромосомы на тестикулярный фенотип (Krausz, Casamonti, 2017). Определенные Y-гаплогруппы, которые несут фиксированную делецию gr/gr, могут присутствовать с высокой частотой в некоторых этнических популяциях и влиять на фенотипическое проявление делеций через еще неизвестные генетические факторы (Sin et al., 2010; Rozen et al., 2012; Lo Giacco et al., 2014; Mokánszki et al., 2018). В популяции северной Индии делеция gr/gr является фактором риска нарушения сперматогенеза, где эта делеция не зафиксирована в гаплогруппах R and H, наиболее распространенных в этом регионе (Bansal et al., 2016b).

Частичные AZFc делеции b1/b3 или b2/b3 удаляют более половины AZFc региона и по 12 генных копий и транскрипционных единиц. Механизм формирования делеции b1/b3 включает гомологичную рекомбинацию между се-

стринскими хроматидами или внутри хроматиды. Из-за низкой частоты делеции b1/b3 ее влияние на сперматогенез остается неясным, но некоторые авторы обнаруживают повышение риска нарушений сперматогенеза у мужчин с делецией b1/b3 (Krausz, Casamonti, 2017). Частичная делеция b2/b3 удаляет более половины AZFc региона, включая две копии гена *DAZ* и одну копию гена *CDY1*. Молекулярный механизм делеции b2/b3 сложен, поскольку ей предшествует инверсия, и приводит к сохранению двух копий гена *DAZ*, гена *BPY2* и гена *CDY1*. Высокая частота делеции b2/b3 отмечается в популяциях Северной Евразии, где она фиксирована в Y-гаплогруппе N и не является фактором риска нарушения сперматогенеза и бесплодия, но негативно влияет на сперматогенез и фертильность, если находится вне этой гаплогруппы, например, у монголоидного, восточноазиатского и африканского населения (Rozen et al., 2012; Bansal et al., 2016a; Colaco, Modi, 2018; Hallast et al., 2021).

В клинической практике тестирование на наличие AZF-делеций Y-хромосомы рекомендуется мужчинам с бесплодием, азооспермией или тяжелой олигозооспермией с диагностической целью, что в ряде случаев позволяет установить генетическую причину нарушенного сперматогенеза. Диагностика AZF-делеций Y-хромосомы имеет также прогностическое значение и позволяет решить вопрос о возможности хирургического получения сперматозоидов методом micro-TESE для последующего проведения ЭКО/ИКСИ. Для пациентов с полной делецией AZFc и азооспермией прогноз получения сперматозоидов благоприятный, в то время как биопсия яичка методом micro-TESE у носителей полных микроделеций регионов AZFa или AZFb практически неэффективна (Krausz, Casamonti, 2017; Kuroda et al., 2020).

Фертильные мужчины – носители частичных микроделеций AZFc или мужчины с бесплодием и частичными микроделециями AZFc, чьи партнерши рожают детей с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (ИКСИ, micro-TESE или TESA), могут передавать делеции сыновьям (Pan et al., 2018; Deng et al., 2023). Более того, в работе (Pan et al., 2018) у фертильных отцов – носителей частичной делеции AZFc (b2/b3) или дупликации AZFc (b2/b3) – сыновья страдали бесплодием и были носителями полных делеций AZFc, AZFb+c или AZFa+b+c. Таким образом, частичные делеции AZFc повышают вероятность других микроструктурных перестроек AZFc региона, которые могут быть фактором риска полной делеции AZFc и бесплодия у мужского потомства.

Хотя в многочисленных работах исследовалась взаимосвязь между нарушениями сперматогенеза, тестикулярным фенотипом и возможностями ВРТ (вспомогательные репродуктивные технологии) у мужчин с различными типами AZF-делеций Y-хромосомы, популяционные частоты этих делеций и, соответственно, их вклад в мужское бесплодие и субфертильность изучены недостаточно. Генетическое тестирование популяционных выборок мужчин рассматривается как полезный прием, позволяющий получить адекватную генетическую информацию о распространенности генетически обусловленного нарушения сперматогенеза, бесплодия и субфертильности мужчин данной популяции, на основании которой можно прогно-

зировать и планировать профилактическую, диагностическую и клиническую работу по сохранению и улучшению репродуктивного здоровья населения. Такие данные могут являться основанием для дальнейших генетических исследований по этиологии бесплодия и выяснению его причин, позволят получить информацию о мутационном спектре, ассоциированном с нарушениями сперматогенеза, и определить генетическую структуру демографических рисков в популяции.

Цель нашей работы – анализ спектра и распространенности AZF-делетий Y-хромосомы и поиск ассоциации с показателями сперматогенеза у славянских мужчин из общей российской популяции.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие молодые мужчины-славяне (белорусы, украинцы, русские) ($n = 700$) из пяти российских городов: Архангельска ($n = 77$), Новосибирска ($n = 324$), Кемерово ($n = 205$), Улан-Удэ ($n = 69$), Якутска ($n = 25$). Выборка включала также потомков смешанных браков русских с белорусами, украинцами и поляками (7.1 %). Дизайн исследования и стандартизированный протокол формирования выборки описаны подробно в других наших работах (Osadchuk et al., 2021, 2022). Выборка состояла из мужчин из общей популяции независимо от статуса фертильности. Все они родились или прожили не менее 3–5 лет в указанных городах. Большинство участников являлись студентами или сотрудниками высших учебных заведений и ранее не проходили осмотра у врача-androлога. Все участники были добровольцами и не получали денежного вознаграждения. Мужчины заполняли анкеты, включающие вопросы о возрасте, месте рождения, национальности, профессии, характере труда, отмечали службу в армии, курение, употребление алкоголя, перенесенные и текущие заболевания. Этническая принадлежность оценивалась на глубину двух поколений – у участника, его родителей, бабушек и дедушек со стороны обоих родителей. Все участники подписали добровольное информированное согласие. Исследование одобрено Этическим комитетом Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 160 от 17.09.2020).

Врач-androлог проводил физикальный осмотр и сбор анамнеза, отмечал текущие расстройства мочеполовой системы. Результаты фиксировались в протоколе, каждому добровольцу был поставлен предварительный андрологический диагноз. У всех участников записывали возраст, измеряли рост (см) и массу тела (кг). Битестикулярный объем (БТО) (мл) оценивали с помощью орхидометра Прадера. Критериями исключения были острые заболевания, прием лекарств или процедур, влияющих на качество спермы (анаболики, антибиотики и др.). Предварительным условием участия было воздержание от половых контактов в течение 2–7 дней до исследования. Образцы эякулята для дальнейшего лабораторного анализа участники сдавали в специальном лабораторном помещении путем мастурбации в разовые стерильные пластиковые контейнеры. Время воздержания от половой жизни перед сдачей эякулята составляло 4 дня (медиана).

Сбор и анализ эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO..., 2010, 2021). Концентрацию сперматозоидов в эякуляте определяли с помощью камеры Горяева после окраски аликвоты эякулята трипановым синим. Долю подвижных сперматозоидов с прогрессивным прямолинейным движением и скоростью более 25 и 2–25 мкм/с (категории А и В соответственно) оценивали с помощью спермоанализатора SFA–500-2 («Биола», Россия). Анализ морфологических характеристик сперматозоидов выполняли в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO..., 2021). Мазки эякулята окрашивали набором Diff-Quik («Абрис+», Россия). Анализировали первые 200 сперматозоидов под световым микроскопом Axio Skop.A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$ под иммерсией. Размеры сперматозоида оценивали с помощью окуляр-микрометра. Исследование морфологии сперматозоидов было проведено подготовленным сотрудником дважды в случайном и слепом порядке. Для определения индекса тератозооспермии (TZI) общее количество выявленных морфологических дефектов делили на количество морфологически аномальных сперматозоидов.

Геномную ДНК экстрагировали из лейкоцитов периферической крови общепринятым фенол-хлороформным методом. Детекцию микроделеций в локусе AZF выполняли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени на ДНК-амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). На первом этапе для выявления делеций анализировали наличие или отсутствие 13 STS-маркеров с помощью коммерческих наборов «РеалБест-Генетика AZF-микроделеции» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Протокол проведения реакции амплификации включал: первая стадия: 50 °C – 2 мин; вторая стадия: 95 °C – 2 мин; третья стадия: 50 циклов (94 °C – 10 с, 60 °C – 20 с). Для выявления делеций локуса AZF выбраны следующие STS-маркеры: sY86, sY84, sY615 – для AZFa региона; sY127, sY134, sY142 – для AZFb региона; sY1196, sY1191, sY254, sY255, sY1291, sY1206, sY1125 – для AZFc региона. Частичные AZFc-делетии b2/b3 и gr/gr были представлены отсутствием маркеров sY1191 и sY1291 соответственно; полная AZFc-делетия b2/b4 – маркеров sY1191, sY1206, sY1291, sY254, sY255; частичная AZFc-делетия b1/b3 – маркеров sY1191, sY1196, sY1291. Типирование STS-маркеров проводили с использованием пяти реакционных смесей (ГРЦ). ГРЦ1 включала маркеры гена *SRY* (ген, определяющий мужской пол), sY134, sY84, sY254; ГРЦ2 – *HMD5* (ДНК гена *HMD5* для дополнительного контроля), sY127, sY86, sY255; ГРЦ3 – *HMD5*, sY142, sY615; ГРЦ4 – sY1191, sY1196, sY1206, sY1125; ГРЦ5 – *SRY*, sY1291. Генотипирование гена *SRY* и ауто-сомного гена *HMB5* (качество контроля взятия материала) проводилось в качестве внутреннего контроля.

На втором этапе для наиболее часто встречающихся частичных микроделеций AZFc региона – b2/b3 (маркер sY1191) и gr/gr (маркер sY1291) – проведена верификация с использованием двух дополнительных STS-маркеров – sY1192, sY1189, тесно сцепленных с соответствующими маркерами. Детекцию STS-маркеров sY1192 и sY1189 выполняли с помощью их амплификации. Протокол реакции амплификации двухшаговый: 50 °C – 2 мин, 95 °C – 2 мин,

Таблица 1. Антропометрические и спермиологические показатели у мужчин популяционной выборки и после стратификации на категории по концентрации сперматозоидов в эякуляте

Показатель	Вся выборка (n = 700)	Категории КС			
		КС = 0 млн/мл (n = 19)	КС ≤ 5 млн/мл (n = 33)	16 > КС > 5 млн/мл (n = 74)	КС ≥ 16 млн/мл (n = 574)
Возраст, лет	25.8 (7.6)	28.5 (8.6)	23.2 (4.9)	25.0 (6.2)	26.0 (7.8)
Масса тела, кг	78.3 (14.0)	81.7 (15.5)	76.9 (14.0)	76.9 (13.6)	78.4 (14.0)
Рост, см	179.0 (6.9)	179.3 (6.32)	178.6 (7.9)	178.7 (7.9)	179.0 (6.7)
БТО, мл	40.6 (8.8)	35.7 (12.0) ^b	35.5 (7.8) ^b	37.2 (7.1) ^b	41.5 (8.7) ^a
Объем эякулята, мл	3.7 (1.7)	3.4 (1.3)	3.5 (1.8)	3.7 (1.6)	3.7 (1.7)
ОКС, млн/эякулят	190.1 (185.1)	0	10.1 (9.1) ^b	42.6 (26.7) ^b	225.8 (185.9) ^a
КС, млн/мл	54.21 (43.31)	0	2.76 (1.55) ^b	11.12 (2.97) ^b	64.52 (41.12) ^a
Подвижность, %	43.3 (27.2)	–	3.3 (2.2) ^b	9.4 (7.2) ^b	50.0 (24.2) ^a
Морфология, %	6.96 (3.23)	–	2.76 (2.58) ^b	3.91 (1.92) ^b	7.56 (3.05) ^a
TZI	1.49 (0.12)	–	1.66 (0.13) ^b	1.58 (1.88) ^b	1.47 (0.11) ^a

Примечание. Данные представлены как среднее (SD). БТО – битестикулярный объем; ОКС – общее количество сперматозоидов в эякуляте; КС – концентрация сперматозоидов; подвижность – доля подвижных сперматозоидов категории A+B; морфология – доля морфологически нормальных сперматозоидов; TZI – индекс тератозооспермии. ^{a, b} Буквенные индексы означают достоверность различий между группами ($p < 0.05$).

40 циклов (95 °C – 10 с, 66 °C – 20 с) с последующим электрофорезом в 1.2 % агарозном геле, окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолетовом свете.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета компьютерных программ STATISTICA, версия 8.0. Для всех показателей высчитывали среднее (SD). Проверку на нормальность распределения изучаемых параметров выполняли при помощи теста Колмогорова–Смирнова. Поскольку большинство параметров не подчинялось нормальному распределению, то, чтобы найти различия в исследуемых антропометрических и спермиологических параметрах между группами с различной концентрацией сперматозоидов в эякуляте или между группами с различными типами частичных микроделетий AZFc, был проведен однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis ANOVA) и ковариационный анализ (analysis of covariance ANCOVA). В последнем случае спермиологические параметры корректировались на возраст и период воздержания. Для попарного сравнения групп применяли тест Дункана (Duncan’s test). Сравнение частот микроделетий AZFc региона между группами проводили с использованием критерия χ^2 -квадрат, $p < 0.05$ считали статистически значимым.

Характеристика популяционной выборки славянских мужчин. По результатам физикального обследования и данным анамнеза в выборке выявлены 16 (2.3 %) человек с гипоплазией яичек, 50 (7.1 %) – с варикоцеле второй и третьей степени, 8 (1.1 %) – перенесших операцию по поводу крипторхизма, 43 (6.4 %) – перенесших операцию варикоцелэктомии. Из 700 участников 2.7 % страдали азооспермией, 4.7 % – тяжелой олигозооспермией, 10.6 % – умеренной олигозооспермией, но 82.0 %

характеризовались нормальной концентрацией сперматозоидов (КС) в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO..., 2021).

По концентрации сперматозоидов в эякуляте участники были стратифицированы на четыре группы: КС = 0 млн/мл (азооспермия, отсутствие сперматозоидов в эякуляте); КС ≤ 5.0 млн/мл (тяжелая олигозооспермия); 16.0 > КС > 5.0 млн/мл (умеренная олигозооспермия); КС ≥ 16.0 млн/мл (концентрация сперматозоидов в норме). Антропометрические и спермиологические показатели мужчин в группах с различной концентрацией сперматозоидов в эякуляте представлены в табл. 1. Между группами не обнаружено различий по возрасту, антропометрическим показателям и объему эякулята. Общее количество, концентрация, доля подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов и БТО в группе с нормальной концентрацией сперматозоидов в эякуляте были достоверно выше ($p < 0.05$), а TZI – достоверно ниже ($p < 0.05$) по сравнению с группами олигозооспермии, которые не различались между собой по этим показателям.

Результаты

Распространенность различных типов микроделетий AZFc региона в исследуемой популяционной выборке славян

Поскольку в исследование включены славяне, проживающие в пяти городах России, то было проведено сравнение распространенности AZFc-микроделетий в каждой выборке (табл. 2). Статистический анализ не выявил достоверных межрегиональных различий в частоте частичных микроделетий b2/b3 и gr/gr ($\chi^2_8 = 6.46, p < 0.595$).

Из исследуемой выборки мужчин в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO..., 2021) сформированы две

Таблица 2. Частота частичных микроделеций AZFc региона (b2/b3 и gr/gr) у мужчин-славян в выборках из исследуемых городов России

Город	n	b2/b3	gr/gr n (%)
Архангельск	77	16 (20.8)	1 (1.3)
Новосибирск	324	46 (14.2)	13 (4.0)
Кемерово	204	39 (19.1)	5 (2.5)
Улан-Удэ	69	13 (18.8)	2 (2.9)
Якутск	25	3 (12.0)	0 (0)
Всего	699	117 (16.7)	21 (3.0)

группы: с нормальными показателями спермограммы (нормозооспермия, $n = 417$) и с отклонениями параметров спермограммы от референсных значений (патозооспермия, $n = 282$), у которых либо концентрация сперматозоидов составляла менее 16 млн/мл, либо доля подвижных сперматозоидов категории А+В была менее 30 %, либо доля морфологически нормальных сперматозоидов была менее 4 %, либо наблюдалась любая комбинация этих отклонений. Обе группы сравнили между собой по частоте микроделеций AZFc региона b2/b3 и gr/gr, результаты представлены в табл. 3. Статистический анализ не выявил различий по частоте делеций b2/b3 и gr/gr между группой нормозооспермии и патозооспермии ($\chi^2_2 = 0.21$, $p < 0.90$). Следовательно, патозооспермия не ассоциирована с повышением частоты обоих типов частичных AZFc-делеций.

Распространенность различных типов AZFc-делеций в популяционной выборке мужчин, а также в группах с различной концентрацией сперматозоидов в эякуляте представлена в табл. 4. Микроделеции Y-хромосомы обнаружены у 139 (19.9 %) из 700 мужчин, среди них не было микроделеций AZFa, AZFb и AZFb+c. Полная AZFc-делеция (b2/b4) была выявлена у одного мужчины (0.1 %), который характеризовался азооспермией. Выявлены следующие типы частичных AZFc-делеций: gr/gr – у 21 (3.0 %), b2/b3 – у 117 (16.7 %) мужчин. Суммарная частота обоих типов AZFc-делеций не различалась между группами с разной концентрацией сперматозоидов в эякуляте ($\chi^2_3 = 1.10$, $p = 0.78$), так же как частоты отдельных типов частичных AZFc-делеций – gr/gr ($\chi^2_3 = 4.73$, $p = 0.19$) и b2/b3 ($\chi^2_3 = 2.14$, $p = 0.54$). Таким образом, не обнаружено различий в частоте AZFc-делеций gr/gr и b2/b3 между группами с разной концентрацией сперматозоидов в эякуляте, что указывает на отсутствие влияния этих делеций на продукцию сперматозоидов у славянских мужчин.

Поиск ассоциаций между частичными микроделециями AZFc региона и показателями сперматогенеза

Проведено сравнение спермиологических показателей у мужчин с частичными микроделециями AZFc региона (b2/b3 и gr/gr) и без микроделеций (табл. 5). Не выявлено различий по всем спермиологическим параметрам между группами мужчин-носителей делеций b2/b3 и gr/gr и мужчинами без микроделеций. Таким образом, в нашей работе не установлено влияния частичных AZFc-делеций (b2/b3 и gr/gr) на исследуемые параметры сперматогенеза у славянских мужчин.

Таблица 3. Частота частичных микроделеций AZFc региона (b2/b3 и gr/gr) в популяционной выборке мужчин-славян и в группах с нормозооспермией и патозооспермией

Состояние сперматогенеза	n	b2/b3	gr/gr n (%)	Без AZF делеций
Нормозооспермия	417	68 (16.3)	12 (2.9)	337 (80.8)
Патозооспермия	282	49 (17.4)	9 (3.2)	224 (79.4)
Всего	699	117 (16.7)	21 (3.0)	561 (80.3)

Примечание. Нормозооспермия – концентрация сперматозоидов ≥ 16.0 млн/мл, доля подвижных сперматозоидов категории А+В ≥ 30 %, доля морфологически нормальных сперматозоидов ≥ 4.0 % (WHO..., 2021); патозооспермия – концентрация сперматозоидов, доля прогрессивно подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов ниже референсных значений нормы (либо каждый показатель, либо любое их сочетание). Носитель полной AZFc-микроделеции b2/b4 не включен в таблицу.

Таблица 4. Частота различных типов микроделеций AZFc региона в популяционной выборке мужчин-славян и в группах, стратифицированных по концентрации сперматозоидов в эякуляте

Категория КС	n	Все типы AZFc	b2/b3	gr/gr	b2/b4	Без AZF делеций
				n (%)		
Азооспермия	19	4 (21.1)	1 (5.3)	2 (10.5)	1 (5.3)	15 (78.9)
КС ≤ 5 млн/мл	33	6 (18.2)	6 (18.2)	0	0	27 (81.8)
16 > КС > 5 млн/мл	74	18 (24.3)	15 (20.3)	3 (4.1)	0	56 (75.7)
КС ≥ 16 млн/мл	574	111 (19.3)	95 (16.6)	16 (2.8)	0	463 (80.7)
Вся выборка	700	139 (19.9)	117 (16.7)	21 (3.0)	1 (0.1)	561 (80.1)

Примечание. Азооспермия – нет сперматозоидов в эякуляте; КС – концентрация сперматозоидов в эякуляте.

Таблица 5. Спермиологические показатели у мужчин-славян с различными типами частичных микроделеций AZFc региона (b2/b3 и gr/gr)

Показатель	b2/b3 (n = 117, 16.7 %)	gr/gr (n = 21, 3.0 %)	Без AZF-делеций (n = 561, 80.1 %)
БТО, мл	40.6 (9.1)	41.1 (8.7)	40.6 (8.8)
Объем эякулята, мл	3.3 (1.5)	3.5 (1.7)	3.7 (1.8)
ОКС, млн/эякулят	163.8 (131.5)	148.4 (121.8)	197.5 (195.8)
КС, млн/мл	51.84 (39.54)	40.62 (29.90)	55.31 (44.40)
Подвижность, %	44.1 (25.9)	34.3 (19.1)	46.0 (26.6)
Морфология, %	6.74 (3.23)	6.45 (3.41)	7.26 (3.13)
TZI	1.48 (0.12)	1.52 (0.16)	1.48 (0.12)

Примечание. Данные представлены как среднее (SD). Показатели подвижности, морфологии и TZI рассчитаны без учета участников с азооспермией и тяжелой олигозооспермией.

Обсуждение

Глобальная распространенность полных AZF-делеций, т. е. удаляющих полностью один или несколько регионов, среди мужчин с бесплодием составляет 7.5 %, что значительно выше, чем в общей популяции – 0.025 % (Colaso, Modi, 2018; Cioppi et al., 2021). В мультиэтнической группе российских мужчин с бесплодием и азоо/олигозооспермией распространенность полных делеций AZF регионов варьировала от 7.5 до 12 % (Черных и др., 2006; Михайленко и др., 2019), что близко к показателям в других странах Европы и Азии. В нашей выборке славянских мужчин из общей популяции выявлен только один мужчина с полной AZFc-делецией b2/b4 и азооспермией, что подтверждает низкую частоту этого типа AZF-микроделеций в общей популяции. Требуется значительное увеличение размера выборки, чтобы выяснить распространенность полных AZFc-микроделеций у славян.

У славянских мужчин из европейских стран распространенность полных делеций различных AZF регионов ниже, чем у российских. Например, частота полных AZF-микроделеций в Словакии у мужчин с азооспермией составила 3.35 % (Behulova et al., 2011), в Словении у субфертильных мужчин – 4.4 % (Peterlin et al., 2002), в Македонии у мужчин с бесплодием – 4.1 % (Plaseski et al., 2006). У неславянского населения Европы частота полных AZF-микроделеций у мужчин с бесплодием варьировала также в пределах 2.4–4.0 % (Lo Giacco et al., 2014; Mokánszki et al., 2018; Johnson et al., 2019).

В азиатских странах у пациентов с бесплодием и азоо/олигозооспермией выявлены более высокие частоты полных AZF-микроделеций: в Китае – 10.7–12.9 % (Liu et al., 2019; Fu et al., 2023), Японии – 7.5 % (Iijima et al., 2020), Турции – 9.6–25.0 % (Akbarzadeh Khiavi et al., 2020), Иране – 12.1–20.6 % (Bahmanimehr et al., 2018), Индии – 10.0–16.1 % (Waseem et al., 2020). Несмотря на широкую изученность географической и этнической вариабельности частоты полных микроделеций Y-хромосомы, причины выявленной вариабельности остаются неизвестными, но в значительной степени они могут быть обусловлены критериями формирования выборки.

Полные делеции AZF регионов Y-хромосомы встречаются редко, большинство (>80 %) – это частичные микроделеции AZFc региона (Krausz, Casamonti, 2017; Cioppi et

al., 2021). В нашей выборке славян из общей российской популяции выявлены два типа частичных AZFc-делеций – gr/gr и b2/b3. Суммарная распространенность этих типов делеций составила 19.7 %, из них частота делеции gr/gr – 3.0 %, а делеции b2/b3 – 16.7 %, причем частота делеций b2/b3 и gr/gr в группе нормозооспермии не отличалась от таковой в группе патозооспермии. Поскольку эти типы делеций (b2/b3 и gr/gr) найдены у мужчин с нормозооспермией, то они не являются маркерами нарушения сперматогенеза. Следует отметить, что информация о частоте этих типов частичных AZFc-делеций у мужчин из общей популяции весьма скудная, но имеются данные об их частоте у российских мужчин с бесплодием и азоо/олигозооспермией и у фертильных мужчин с нормозооспермией (табл. 6). В мультиэтнической российской выборке фертильных мужчин с нормозооспермией (Барков и др., 2014) или у мужчин из бесплодных пар и с нормозооспермией (Зобкова и др., 2017) частоты делеций b2/b3 и gr/gr близки к нашим данным (см. табл. 6). В обеих работах не выявлены различия по частоте делеции b2/b3 между группами нормозооспермии и азоо/олигозооспермии, что тоже совпадает с нашими выводами. У российских фертильных мужчин (состояние сперматогенеза не указано) частоты делеций b2/b3 и gr/gr практически совпадают с нашими данными (Черных и др., 2022). Также обращает на себя внимание более высокая частота делеции gr/gr у мужчин с бесплодием или из бесплодных пар с патозооспермией по сравнению с нормозооспермией (различия статистически недостоверны), что может быть связано с мультиэтническим составом исследуемых групп и, соответственно, с различным генетическим бэкграундом Y-хромосомы. В совокупности данные подтверждают, что у российских мужчин наиболее распространенными типами частичных делеций AZFc региона являются b2/b3 и gr/gr, а практическое отсутствие различий в частоте этих делеций между мужчинами с нормо- и патозооспермией указывает на отсутствие негативных эффектов частичных делеций b2/b3 и gr/gr на сперматогенез.

Интересно отметить, что в Эстонии у фертильных мужчин с нормозооспермией или с бесплодием и патозооспермией установлена более высокая по сравнению с нашими данными частота делеции b2/b3 и близкая к нашим данным частота делеции gr/gr (Hallast et al., 2021)

Таблица 6. Частота частичных AZFc-микроделеций Y-хромосомы у мужчин различного этнического происхождения и региона проживания

Страна	n	Состояние сперматогенеза	Кол-во STS-маркеров	Частота AZFc-микроделеций b2/b3 и gr/gr, %	Литературный источник
Россия, славяне	700	Общая популяция: 417 патозооспермия 282 нормозооспермия	15	Патозооспермия: b2/b3 – 16.3, gr/gr – 2.9 нормозооспермия: b2/b3 – 17.4, gr/gr – 3.2	Наши данные
Россия	272	146 патозооспермия (бесплодные) 126 нормозооспермия (фертильные)	14	Патозооспермия: b2/b3 – 13.7, gr/gr – 8.2; нормозооспермия: b2/b3 – 14.3, gr/gr – 2.4	Барков и др., 2014
	205	Бесплодные пары: 143 патозооспермия 62 нормозооспермия	14	Патозооспермия: b2/b3 – 11.00, gr/gr – 9.79; нормозооспермия: b2/b3 – 8.06, gr/gr – 3.21	Зобкова и др., 2017
	436	436 фертильных без анализа эякулята	6	Фертильные: b2/b3 – 14.7, gr/gr – 2.3	Черных и др., 2022
Эстония	2324	Без полных AZF-делей: 1190 азоо/олигозооспермия (бесплодные) 1134 нормозооспермия (фертильные/молодые)	9	Азоо/олигозооспермия: b2/b3 – 32.6, gr/gr – 2.7*; нормозооспермия: b2/b3 – 32.4, gr/gr – 1.2	Hallast et al., 2021
Италия	600	337 азоо/олигозооспермия (бесплодные) 263 нормозооспермия (фертильные)	10+8	Азоо/олигозооспермия: b2/b3 – 0.3, gr/gr – 4.7*; нормозооспермия: b2/b3 – 0, gr/gr – 0.4	Ferlin et al., 2005
Германия	518	Без полных AZF-делей: 348 азоо/олигозооспермия 170 нормозооспермия	5+4	Азоо/олигозооспермия: b2/b3 – 0.6, gr/gr – 4.0 нормозооспермия: b2/b3 – 2.9, gr/gr – 1.8	Hucklenbroich et al., 2005
Испания	715	330 азоо/олигозооспермия (бесплодные) 385 нормозооспермия (фертильные)	6	Азоо/олигозооспермия: b2/b3 – 1.3*, gr/gr – 3.9*; нормозооспермия: b2/b3 – 0, gr/gr – 1.4	Lo Giacco et al., 2014
Венгрия	456	357 азоо/олигозооспермия (бесплодные) 111 нормозооспермия	5	Азоо/олигозооспермия: b2/b3 – 2.6, gr/gr – 4.2*; нормозооспермия: b2/b3 – 2.7, gr/gr – 1.8	Mokánszki et al., 2018
Иран	265	154 азоо/олигозооспермия (бесплодные) 111 нормозооспермия	6+6	Азоо/олигозооспермия: b2/b3 – 1.8, gr/gr – 5.2; нормозооспермия: b2/b3 – 0, gr/gr – 1.8	Alimardanian et al., 2016
Турция	420	333 НОА/ОАТ (бесплодные) 87 нормозооспермия (65 фертильных)	5	НОА/ОАТ: b2/b3 – 8.1, gr/gr – 5.1; нормозооспермия: b2/b3 – 10.3, gr/gr – 12.6	Beyaz et al., 2017
Китай, этнос Хань	1435	Без полных AZF-делей: 654 НОА/олигозооспермия (бесплодные) 781 фертильные	8	НОА/олигозооспермия: b2/b3 – 9.5*, gr/gr – 10.7; фертильные: b2/b3 – 6.3, gr/gr – 8.6	Lu et al., 2014
Китай, этнос Ыи	377	224 НОА/олигозооспермия (бесплодные) 153 фертильные без анализа эякулята	6	НОА/олигозооспермия: b2/b3 – 6.3, gr/gr – 7.6; фертильные: b2/b3 – 8.5, gr/gr – 8.5	Ye et al., 2013
Индия, индоевропейцы	1047	619 патозооспермия (бесплодные) 203 нормозооспермия (бесплодные) 225 фертильные без анализа эякулята	6+6	Патозооспермия: b2/b3 – 0.32, gr/gr – 4.84*; нормозооспермия: b2/b3 – 0, gr/gr – 8.87*; фертильные: b2/b3 – 0.44, gr/gr – 0.89	Bansal et al., 2016b

Примечание. НОА – необструктивная азооспермия; ОАТ – олигоастенотератоозоспермия. * Достоверность различий между группами пато- и нормозооспермии (фертильные), $p < 0.05$.

(см. табл. 6). Около двух третей эстонских мужчин, несущих делецию gr/gr, принадлежали к гаплогруппе R1, а почти все (99.4 %) мужчины, несущие делецию b2/b3, относились к Y-гаплогруппе N3. Частота делеции b2/b3 не различалась между группами с пато- и нормозооспермией, что совпадает с выводами нашей работы, однако частота делеции gr/gr была значительно выше в группе патозооспермии по сравнению с группой нормозооспермии. В то же время андрологические показатели у мужчин с делециями b2/b3 или gr/gr и без делеции не различались.

У мужчин из других европейских стран наблюдается более низкая распространенность частичных AZFc-делеций, причем большинство AZFc-делеций представлено делецией gr/gr (см. табл. 6). В Италии (Ferlin et al., 2005), Германии (Hucklenbroich et al., 2005), Испании (Lo Giacco et al., 2014), Венгрии (Mokánszki et al., 2018) частота делеции b2/b3 варьировала у пациентов с нормозооспермией от 0 до 2.7 %, с азоо/олигозооспермией – от 0.3 до 2.6 %, а частота делеции gr/gr у мужчин с нормозооспермией – от 0.4 до 1.8 %, с азоо/олигозооспермией – от 3.9 до 4.7 %. Результаты этих европейских работ указывают на делецию gr/gr как на генетическую причину снижения продукции сперматозоидов, хотя некоторые авторы считают, что делеция gr/gr является только фактором риска, предрасполагающим к нарушению сперматогенеза.

В азиатских странах наблюдается более высокая географическая гетерогенность частоты частичных делеций AZFc региона по сравнению с Россией (см. табл. 6). Например, в Иране частота делеции b2/b3 варьировала у мужчин в диапазоне 0–1.8 %, что значительно ниже российских данных, а делеции gr/gr – в диапазоне 1.8–5.2 %, что близко к российским данным, причем негативного влияния этих типов частичных делеций на сперматогенез не установлено (Alimardanian et al., 2016). У турецких мужчин частота частичных делеций b2/b3 значительно ниже по сравнению с российскими, но оба типа делеций (b2/b3 и gr/gr) не ассоциированы с бесплодием и снижением продукции сперматозоидов (Beyaz et al., 2017). Напротив, скрининг частичных делеций gr/gr и b2/b3 в популяции китайцев этнической группы Хань показал, что частота делеции b2/b3 была значительно выше у пациентов с бесплодием и азоо/олигозооспермией, чем в группе фертильных мужчин с нормозооспермией, что указывает на ассоциацию этой делеции с нарушением сперматогенеза (Lu et al., 2014). Однако у китайских мужчин этнической группы Йи такой ассоциации не обнаружено (Ye et al., 2013), что подтверждает важность учета этнического состава популяции при изучении эффектов частичных делеций AZFc региона Y-хромосомы на сперматогенез. В индийской популяции частота делеции b2/b3 была в 40–45 раз ниже, а делеции gr/gr – в 2–3 раза выше по сравнению с российскими популяциями, а среди частичных AZFc-делеций наиболее распространенными и значимыми были gr/gr, которые снижали концентрацию сперматозоидов, увеличивая риск бесплодия (Bansal et al., 2016b) (см. табл. 6).

Приведенные данные подтверждают высказанную ранее идею (Rozen et al., 2012), что географическое и этническое происхождение популяции может влиять на частоту частичных AZFc-делеций b2/b3 и gr/gr. В упомянутом

исследовании приведена оценка распространенности частичных микроделеций gr/gr и b2/b3 у 20884 мужчин из пяти популяций (Индия, Польша, Тунис, США, Вьетнам). Установлено, что частота частичной делеции gr/gr варьировала от 2.1 % (США) до 15 % (Вьетнам), а b2/b3 – от 0.5 % (Индия) до 2.2 % (Польша). Авторы предположили, что этногеографические различия в частоте делеции b2/b3, по-видимому, обусловлены различиями в распространенности хромосом гаплогруппы N1, а делеции gr/gr – хромосом гаплогруппы D2a, содержащих эти делеции, что соответствует гипотезе о связи частоты частичных AZFc-делеций с генетическим фоном Y-хромосомы.

Анализ спермиологических фенотипов у носителей микроделеций Y-хромосомы показывает, что если полная делеция одного или нескольких AZF регионов ассоциирована с нарушениями сперматогенеза и служит специфичным генетическим маркером нарушения сперматогенеза и бесплодия, то частичные AZFc-делеции демонстрируют гетерогенность в отношении спермиологического фенотипа и часто являются только факторами риска, предрасполагающими к патозооспермии и бесплодию. В нашей выборке славянских мужчин из общей популяции не было обнаружено негативных эффектов делеций b2/b3 и gr/gr на сперматогенез. В другом российском исследовании у мужчин с бесплодием и носителей микроделеций gr/gr и b2/b3 (3.5 и 7.9 % от общего числа обследованных) концентрация сперматозоидов составила 12.2 ± 7.1 и 30.3 ± 5.3 млн/мл соответственно, т. е. у носителей делеции gr/gr была ниже нормы (Черных и др., 2014). Негативная ассоциация делеции gr/gr с концентрацией сперматозоидов может объясняться мультиэтническим составом выборки и, следовательно, разным генетическим фоном Y-хромосомы. Микроделеция gr/gr не выявила статистически значимую связь с нарушениями сперматогенеза у других славянских народов – болгар (Levkova et al., 2020) и македонцев (Kuzmanovska et al., 2019).

В некоторых монголоидных популяциях не установлено негативных эффектов делеции gr/gr на сперматогенез, например, у китайцев этнической группы Хань (Yang et al., 2010) или у японцев (Sin et al., 2010), если делеция gr/gr фиксирована в распространенных гаплогруппах Q1 и D2b соответственно, что играет роль в клиническом проявлении делеции. Однако у корейцев делеция gr/gr вызывает нарушение сперматогенеза, если она не фиксирована в распространенной гаплогруппе YAP (предшественница гаплогруппы D2b), и наблюдается нормальный тестикулярный фенотип, когда она находится в гаплогруппе YAP (Choi et al., 2012). В африканской популяции Туниса частичные делеции gr/gr и b2/b3 не связаны с нарушениями сперматогенеза, что обусловлено фиксацией этих делеций в гаплогруппе E3b2, широко распространенной в Северной Африке (Ghorbel et al., 2012). Напомним, что в европейских популяциях делеция gr/gr ассоциирована с нарушением сперматогенеза, в частности, у испанцев (Lo Giacco et al., 2014), итальянцев (Ferlin et al., 2005), венгров (Mokánszki et al., 2018).

Многие авторы приходят к выводу, что влияние частичной AZFc-делеции b2/b3 на сперматогенез и фертильность в значительной степени зависит от этнического состава исследуемой популяции, а частота и фенотипический эф-

фект определяются происхождением Y-хромосомы. Делеция b2/b3 является фактором риска нарушения сперматогенеза в популяциях Восточной Азии и Африки, но не в популяциях Европы или Южной Азии (Bansal et al., 2016a; Colaco, Modi, 2018). В китайской популяции делеция b2/b3 повышает риск нарушения сперматогенеза и predisполагает к формированию полной делеции AZFc региона (Lu et al., 2014), однако в популяции этнических китайцев Хань из восточного Китая делеция b2/b3 не связана с нарушением сперматогенеза, что авторы объясняют межпопуляционными различиями в частотах Y-гаплогрупп в Китае (Zhang et al., 2007).

У финно-угорских, балто-славянских и некоторых тюркоязычных народов Северной Евразии частичная AZFc-делеция b2/b3 фиксирована в Y-гаплогруппе N, которая имеет высокую частоту – до 90 % в некоторых популяциях (Repping et al., 2004). Установлено, что делеция b2/b3 не вызывает нарушения сперматогенеза у немцев (Hucklenbroich et al., 2005), тунисцев (Ghorbel et al., 2012), иранцев (Alimardanian et al., 2016), венгров (Mokánszki et al., 2018), эстонцев (Hallast et al., 2021). Популяцию этнических русских тоже можно отнести к этой группе из-за отсутствия связи данной делеции с нарушениями сперматогенеза, высокой частоты делеции b2/b3 и широкой распространенности Y-хромосом гаплогруппы N3, несущей эту делецию, которая варьирует в диапазоне 10–19 % (Степанов и др., 2006; Балановская, Балановский, 2007; Derenko et al., 2007). Предполагается, что влияние делеции b2/b3 в гаплогруппе N уравнивается другими генетическими факторами, возможно, связанными с Y-хромосомой (Repping et al., 2004).

Таким образом, эффекты частичных делеций AZFc на сперматогенез могут зависеть от линии Y-хромосомы (Y-гаплогруппы, несущей делецию), увеличивая или снижая риск нарушения сперматогенеза в определенных популяциях. Поскольку частичные делеции AZFc региона могут быть фиксированы в определенных гаплогруппах Y-хромосомы, популяционная частота частичных AZFc-делеций зависит от частоты этих Y-гаплогрупп, причем влияние частичных AZFc-делеций на сперматогенез может различаться на Y-хромосомах разных гаплогрупп. Например, у японских мужчин наиболее распространены две Y-гаплогруппы: D (34.7 %) и O (51.8 %). Делеции gr/gr были обнаружены у 33.7 % японских мужчин, но частота делеции gr/gr существенно различалась в зависимости от Y-гаплогруппы: она широко распространена в гаплогруппе D (86.2 %) и в значительно меньшей степени – в гаплогруппе O (5.1 %). При этом в гаплогруппе D она была фенотипически нейтральна, т. е. не влияла на сперматогенез, а в гаплогруппе O снижала концентрацию сперматозоидов в эякуляте (Sin et al., 2010). У мужчин Северной Италии сравнение распределения семи Y-гаплогрупп в группе фертильных мужчин и у пациентов с микроделециями не выявило различий, но частота Y-гаплогруппы E с делецией b2/b4 была значительно повышена по сравнению контролем. Результаты свидетельствуют о том, что одни гаплогруппы могут быть более склонны к AZFc-микроделециям b2/b4, чем другие (Arredi et al., 2007).

В популяции этнических русских в России доминирует Y-хромосомная гаплогруппа R1a, которая является

самой распространенной (более 40 %), за ней следуют N3 (10–19 %), I1b (13 %) (Степанов и др., 2006; Балановская, Балановский, 2007; Ilumäe et al., 2016). Несмотря на то что связь фенотипической экспрессии частичных делеций AZFc региона Y-хромосомы с Y-гаплогруппами все еще остается предметом дискуссии, в связи с вышеприведенными фактами представляется перспективным изучение у славянских мужчин ассоциации основных гаплогрупп R1a, N3 и I1b с показателями сперматогенеза, что позволит выяснить модулирующее влияние гаплогруппы на фенотипическое проявление AZFc частичных делеций. Особого внимания заслуживают гаплогруппы N3 и R1a, которые содержат делеции b2/b3 и gr/gr соответственно (Repping et al., 2004; Rozen et al., 2012). Распространенность делеции b2/b3 в нашем исследовании (16.7 %) совпадает с распространенностью гаплогруппы N3 в русской популяции России (10–19 %), которая в составе этой гаплогруппы не влияет на сперматогенез, хотя в составе других гаплогрупп делеция b2/b3 может оказывать негативный эффект на сперматогенный фенотип. Предполагается, что в гаплогруппе N3 негативное влияние делеции на сперматогенез уравнивается другими генетическими факторами, возможно, также связанными с Y-хромосомой (Repping et al., 2004).

Заключение

На выборке славянских мужчин из пяти городов России ($n = 700$) определены спектр и частота AZFc-микроделеций Y-хромосомы. Выявлено 19.9 % носителей AZFc-делеций, из них 16.7 % были носителями частичной делеции b2/b3, 3.0 % – частичной делеции gr/gr, 0.14 % – полной делеции b2/b4. Не обнаружены микроделеции регионов AZFa и AZFb и другие типы AZF-делеций.

Суммарная частота всех типов AZFc-делеций, а также частичных делеций b2/b3 и gr/gr не различалась в группах нормозооспермии и патозооспермии, а также в группах азооспермии, тяжелой олигозооспермии, олигозооспермии и нормальной концентрации сперматозоидов. Спермиологические показатели не различались в группах с разными типами частичных AZFc-делеций и без делеций. Полученные данные указывают на отсутствие патогенетической роли частичных AZFc-делеций в сперматогенезе у славянских мужчин.

Список литературы / References

- Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. М., 2007
[Balanovska E.V., Balanovsky O.P. The Russian Gene Pool on the Russian Plain. Moscow, 2007 (in Russian)]
- Барков И.Ю., Сорока Н.Е., Попова А.Ю., Гамидов С.И., Беляева Н.А., Глинкина Ж.И., Калинина Е.А., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т. Диагностика мужского бесплодия, ассоциированного с микроделециями в локусе AZF хромосомы Y. *Акушерство и гинекология*. 2014;1:59-64
[Barkov I.Yu., Soroka N.E., Popova A.Yu., Gamidov S.I., Belyaeva N.A., Glinkina Zh.I., Kalinina E.A., Trofimov D.Yu., Sukhikh G.T. Diagnosis of male infertility associated with microdeletions at the AZF locus of the Y chromosome. *Akusherstvo i Ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*. 2014;1:59-64 (in Russian)]
- Зобкова Г.Ю., Баранова Е.Е., Донников А.Е., Мсхалая Г.Ж., Залетова В.В., Кошкина Т.Е., Трофимов Д.Ю. Спектр делеций фактора азооспермии (AZF) у мужчин с нормальным и нарушен-

- ным сперматогенезом. *Пробл. репродукции*. 2017;4:109-113. DOI 10.17116/repro2017234109-113
- [Zobkova G.Yu., Baranova E.E., Donnikov A.E., Mskhalaya G.J., Zaletova V.V., Koshkina T.E., Trofimov D.Yu. Range of azoospermia factor (AZF) deletions in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Problemy Reproduktsii = Russian Journal of Human Reproduction*. 2017;4:109-113. DOI 10.17116/repro2017234109-113 (in Russian)]
- Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А., Шадеркина В.А., Аполихин О.И., Сивков А.В., Комарова В.А. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000–2018 годы. *Эксперим. и клин. урология*. 2019;4:4-12. DOI 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12
- [Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A., Shaderkina V.A., Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Komarova V.A. Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000–2018. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Urologiya = Experimental and Clinical Urology*. 2019;4:4-12. DOI 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12 (in Russian)]
- Михайленко Д.С., Соболев И.Ю., Сафронова Н.Ю., Симонова О.А., Ефремов Е.А., Ефремов Г.Д., Алексеев Б.Я., Каприн А.Д., Немцова М.В. Частота выявления делеций AZF, мутаций CFTR и длинных аллелей CAG-повтора AR при первичной лабораторной диагностике в гетерогенной группе пациентов с мужским бесплодием. *Урология*. 2019;3:101-107. DOI 10.18565/urology.2019.3.101-107
- [Mikhaylenko D.S., Sobol I.Y., Safronova N.Y., Simonova O.A., Efremov E.A., Efremov G.D., Alekseev B.Y., Kaprin A.D., Nemtsova M.V. The incidence of AZF deletions, CFTR mutations and long alleles of the AR CAG repeats during the primary laboratory diagnostics in a heterogeneous group of infertile men. *Urologiya*. 2019; 3:101-107. DOI 10.18565/urology.2019.3.101-107 (in Russian)]
- Степанов В.А., Харьков В.Н., Пузырев В.П. Эволюция и филогеография линий Y-хромосомы человека. *Информ. вестн. ВОГиС*. 2006;10(1):57-74
- [Stepanov V.A., Khar'kov V.N., Puzyrev V.P. Evolution and phylogeography of human Y-chromosomal lineages. *Informatsionnyy Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2006;10(1):57-74 (in Russian)]
- Черных В.Б., Чухрова А.Л., Бескоровайная Т.С., Гришина Е.М., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Гоголевский П.А., Калугина А.С., Морина Г.В., Тогобetsкий А.С., Таневский В.Э., Здановский В.М., Гоголевская И.К., Крамеров Д.А., Поляков А.В., Курило Л.Ф. Типы делеций Y-хромосомы и их частота у мужчин с бесплодием. *Генетика*. 2006;42(8):1130-1136
- [Chernykh V.B., Chukhrova A.L., Beskorovainaya T.S., Grishina E.M., Sorokina T.M., Shileiko L.V., Gogolevsky P.A., Kalugina A.S., Morina G.V., Togobetsky A.S., Tanevsky V.E., Zdanovsky V.M., Gogolevskaya I.K., Kramerov D.A., Polyakov A.V., Kurilo L.F. Types of Y chromosome deletions and their frequency in infertile men. *Russ. J. Genet.* 2006;42(8):936-941. DOI 10.1134/S1022795406080138]
- Черных В.Б., Руднева С.А., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Рыжкова О.П., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Характеристика состояния сперматогенеза у мужчин с бесплодием, имеющих различные типы делеций AZFc-региона. *Андрология и генитальная хирургия*. 2014;2:48-57
- [Chernykh V.B., Rudneva S.A., Sorokina T.M., Shileyko L.V., Kurilo L.F., Ryzhkova O.P., Chukhrova A.L., Polyakov A.V. Characteristics of spermatogenesis in infertile men with the AZFc region deletions. *Andrologiya i Genitalnaya Khirurgiya = Andrology and Genital Surgery*. 2014;2:48-57 (in Russian)]
- Черных В.Б., Рыжкова О.П., Кузнецова И.А., Казарян М.С., Сорокина Т.М., Курило Л.Ф., Шагина О.А., Поляков А.В. Делеции AZFc региона Y-хромосомы у российских фертильных мужчин. *Генетика*. 2022;58(7):838-845. DOI 10.31857/S0016675822070049
- [Chernykh V.B., Ryzhkova O.P., Kuznetsova I.A., Kazaryan M.S., Sorokina T.M., Kurilo L.F., Schagina O.A., Polyakov A.V. Deletions in AZFc region of Y chromosome in Russian fertile men. *Russ. J. Genet.* 2022;58(7):850-856. DOI 10.1134/s1022795422070043]
- Akbarzadeh Khiavi M., Jalili A., Safary A., Gharedaghchi Z., Mirinezhad S.K., Mehdizadeh A., Rahmani S.A. Karyotypic abnormalities and molecular analysis of Y chromosome microdeletion in Iranian Azeri Turkish population infertile men. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2020;66(2):140-146. DOI 10.1080/19396368.2019.1682083
- Alimardanian L., Saliminejad K., Razi S., Ahani A. Analysis of partial azoospermia factor c deletion and DAZ copy number in azoospermia and severe oligozoospermia. *Andrologia*. 2016;48(9):890-894. DOI 10.1111/and.12527
- Arredi B., Ferlin A., Speltra E., Bedin C., Zuccarello D., Ganz F., Marchina E., Stuppia L., Krausz C., Foresta C. Y-chromosome haplogroups and susceptibility to azoospermia factor c microdeletion in an Italian population. *J. Med. Genet.* 2007;44(3):205-208. DOI 10.1136/jmg.2006.046433
- Bahmanimehr A., Zeighami S., Namavar Jahromi B., Anvar Z., Parsanezhad M.E., Davari M., Montazeri S. Detection of Y chromosome microdeletions and hormonal profile analysis of infertile men undergoing assisted reproductive technologies. *Int. J. Fertil. Steril.* 2018;12(2):173-177. DOI 10.22074/ijfs.2018.5244
- Bansal S.K., Gupta G., Rajender S. Y chromosome b2/b3 deletions and male infertility: a comprehensive meta-analysis, trial sequential analysis and systematic review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2016a; 768:78-90. DOI 10.1016/j.mrrev.2016.04.007
- Bansal S.K., Jaiswal D., Gupta N., Singh K., Dada R., Sankhwar S.N., Gupta G., Rajender S. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci. Rep.* 2016b;6:19798. DOI 10.1038/srep19798
- Behulova R., Varga I., Strhakova L., Bozikova A., Gabrikova D., Boronova I., Repiska V. Incidence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in Slovak patients with azoospermia. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 2011;155(1): 33-38. DOI 10.5507/bp.2011.006
- Beyaz C.C., Gunes S., Onem K., Kulac T., Asci R. Partial deletions of Y-chromosome in infertile men with non-obstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia in a Turkish population. *In Vivo*. 2017;31(3):365-371. DOI 10.21873/in vivo.11068
- Choi J., Song S.H., Bak C.W., Sung S.R., Yoon T.K., Lee D.R., Shim S.H. Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men. *PLoS One*. 2012;7(8): e43550. DOI 10.1371/journal.pone.0043550
- Cioppi F., Rosta V., Krausz C. Genetics of azoospermia. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(6):3264. DOI 10.3390/ijms22063264
- Colaco S., Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018; 16(1):14. DOI 10.1186/s12958-018-0330-5
- Deng C.Y., Zhang Z., Tang W.H., Jiang H. Microdeletions and vertical transmission of the Y-chromosome azoospermia factor region. *Asian J. Androl.* 2023;25(1):5-12. DOI 10.4103/aja2021130
- Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G., Wozniak M., Grzybowski T., Dambueva I., Zakharov I. Y-chromosome haplogroup N dispersals from south Siberia to Europe. *J. Hum. Genet.* 2007;52(9):763-770. DOI 10.1007/s10038-007-0179-5
- Ferlin A., Tessari A., Ganz F., Marchina E., Barlati S., Garolla A., Engl B., Foresta C. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J. Med. Genet.* 2005;42(3):209-213. DOI 10.1136/jmg.2004.025833
- Fu M., Chen M., Guo N., Lin M., Li Y., Huang H., Cai M., Xu L. Molecular genetic analysis of 1,980 cases of male infertility. *Exp. Ther. Med.* 2023;26(1):345. DOI 10.3892/etm.2023.12044
- Ghorbel M., Gargouri S.B., Zribi N., Abdallah F.B., Cherif M., Keskes R., Chakroun N., Sellami A., McElreavey K., Fakhfakh F., Ammar-Keskes L. Partial microdeletions in the Y-chromosome AZFc region are not a significant risk factor for spermatogenic impairment in Tunisian infertile men. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2012;16(7): 775-779. DOI 10.1089/gtmb.2012.0024







- Hallast P., Kibena L., Punab M., Arciero E., Rootsi S., Grigorova M., Flores R., Jobling M.A., Poolamets O., Pomm K., Korovits P., Rull K., Xue Y., Tyler-Smith C., Laan M. A common 1.6 MB Y-chromosomal inversion predisposes to subsequent deletions and severe spermatogenic failure in humans. *eLife*. 2021;10:e65420. DOI 10.7554/eLife.65420
- Hucklenbroich K., Gromoll J., Heinrich M., Hohoff C., Nieschlag E., Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 2005;20(1):191-197. DOI 10.1093/humrep/deh558
- Iijima M., Shigehara K., Igarashi H., Kyono K., Suzuki Y., Tsuji Y., Kobori Y., Kobayashi H., Mizokami A. Y chromosome microdeletion screening using a new molecular diagnostic method in 1030 Japanese males with infertility. *Asian J. Androl.* 2020;22(4):368-371. DOI 10.4103/aja.aja_97_19
- Illumäe A.M., Reidla M., Chukhryaeva M., Järve M., Post H., Karmin M., Saag L., Agdzhoyan A., Kushniarevich A., Litvinov S., Ekomasova N., Tambets K., Metspalu E., Khusainova R., Yunusbayev B., Khusnutdinova E.K., Osipova L.P., Fedorova S., Utevska O., Koshel S., Balanovska E., Behar D.M., Balanovsky O., Kivisild T., Underhill P.A., Villems R., Rootsi S. Human Y chromosome haplogroup N: a non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families. *Am. J. Hum. Genet.* 2016;99(1):163-173. DOI 10.1016/j.ajhg.2016.05.025
- Johnson M., Raheem A., De Luca F., Hallerstrom M., Zainal Y., Posey S., Mohammadi B., Moubasher A., Johnson T.F., Muneer A., Sangster P., Ralph D.J. An analysis of the frequency of Y-chromosome microdeletions and the determination of a threshold sperm concentration for genetic testing in infertile men. *BJU Int.* 2019;123(2):367-372. DOI 10.1111/bju.14521
- Krausz C., Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum. Genet.* 2017;136(5):637-655. DOI 10.1007/s00439-017-1793-8
- Krausz C., Cioppi F., Riera-Escamilla A. Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2018;18(4):331-346. DOI 10.1080/14737159.2018.1453358
- Krausz C., Navarro-Costa P., Wilke M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state of the art 2023. *Andrology*. 2024;12(3):487-504. DOI 10.1111/andr.13514
- Kuroda S., Usui K., Sanjo H., Takeshima T., Kawahara T., Uemura H., Yumura Y. Genetic disorders and male infertility. *Reprod. Med. Biol.* 2020;19(4):314-322. DOI 10.1002/rmb2.12336
- Kuzmanovska M., Noveski P., Terzic M., Plaseski T., Kubelka-Sabit K., Filipovski V., Lazarevski S., Sukarova Stefanovska E., Plaseska-Karanfilska D. Y-chromosome haplogroup architecture confers susceptibility to azoospermia factor c microrearrangements: a retrospective study. *Croat. Med. J.* 2019;60(3):273-283. DOI 10.3325/cmj.2019.60.273
- Levkova M., Chervenkov T., Angelova L. The association of gr/gr deletion in the Y chromosome and impaired spermatogenesis in Bulgarian males: a pilot study. *Middle East Fertil. Soc. J.* 2020;25:10. DOI 10.1186/s43043-020-00020-9
- Liu T., Song Y.X., Jiang Y.M. Early detection of Y chromosome microdeletions in infertile men is helpful to guide clinical reproductive treatments in southwest of China. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(5):e14350. DOI 10.1097/MD.00000000000014350
- Lo Giacco D., Chianese C., Sánchez-Curbelo J., Bassas L., Ruiz P., Rajmil O., Sarquella J., Vives A., Ruiz-Castañé E., Oliva R., Ars E., Krausz C. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014;22(6):754-761. DOI 10.1038/ejhg.2013.253
- Lu C., Jiang J., Zhang R., Wang Y., Xu M., Qin Y., Lin Y., Guo X., Ni B., Zhao Y., Diao N., Chen F., Shen H., Sha J., Xia Y., Hu Z., Wang X. Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Mol. Hum. Reprod.* 2014;20(9):836-843. DOI 10.1093/molehr/gau043
- Mokánszki A., Ujfalusi A., Gombos É., Balogh I. Examination of Y-chromosomal microdeletions and partial microdeletions in idiopathic infertility in East Hungarian patients. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2018;11(4):329-336. DOI 10.4103/jhrs.JHRS_12_18
- Osadchuk L.V., Shantanova L.N., Troev I.V., Kleshchev M.A., Osadchuk A.V. Regional and ethnic differences in semen quality and reproductive hormones in Russia: a Siberian population-based cohort study of young men. *Andrology*. 2021;9:1512-1525. DOI 10.1111/andr.13024
- Osadchuk L., Vasiliev G., Kleshchev M., Osadchuk A. Androgen receptor gene CAG repeat length varies and affects semen quality in an ethnic-specific fashion in young men from Russia. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(18):10594. DOI 10.3390/ijms231810594
- Pan Y., Li L.L., Yu Y., Jiang Y.T., Yang X., Zhang H.G., Liu R.Z., Wang R.X. Natural transmission of b2/b3 subdeletion or duplication to expanded Y chromosome microdeletions. *Med. Sci. Monit.* 2018;24:6559-6563. DOI 10.12659/MSM.911644
- Peterlin B., Kunej T., Sinkovec J., Gligorievska N., Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum. Reprod.* 2002;17(1):17-24. DOI 10.1093/humrep/17.1.17
- Plaseski T., Novevski P., Kocavska B., Dimitrovski C., Efremov G.D., Plaseska-Karanfilska D. AZF deletions in infertile men from the Republic of Macedonia. *Prilozi*. 2006;27(1):5-16
- Repping S., van Daalen S.K., Korver C.M., Brown L.G., Marszałek J.D., Gianotten J., Oates R.D., Silber S., van der Veen F., Page D.C., Rozen S. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics*. 2004;83(6):1046-1052. DOI 10.1016/j.ygeno.2003.12.018
- Rozen S.G., Marszałek J.D., Irenze K., Skaletsky H., Brown L.G., Oates R.D., Silber S.J., Ardlie K., Page D.C. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;91(5):890-896. DOI 10.1016/j.ajhg.2012.09.003
- Sin H.S., Koh E., Shigehara K., Sugimoto K., Maeda Y., Yoshida A., Kyono K., Namiki M. Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population. *Hum. Reprod.* 2010;25(9):2396-2403. DOI 10.1093/humrep/deq191
- Waseem A.S., Singh V., Makker G.C., Trivedi S., Mishra G., Singh K., Rajender S. AZF deletions in Indian populations: original study and meta-analyses. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020;37(2):459-469. DOI 10.1007/s10815-019-01661-0
- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010
- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization, 2021
- Yang Y., Ma M., Li L., Su D., Chen P., Ma Y., Liu Y., Tao D., Lin L., Zhang S. Differential effect of specific gr/gr deletion subtypes on spermatogenesis in the Chinese Han population. *Int. J. Androl.* 2010;33(5):745-754. DOI 10.1111/j.1365-2605.2009.01015.x
- Ye J.J., Ma L., Yang L.J., Wang J.H., Wang Y.L., Guo H., Gong N., Nie W.H., Zhao S.H. Partial AZF c duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2013;14(9):807-815. DOI 10.1631/jzus.B1200301
- Zhang F., Lu C., Li Z., Xie P., Xia Y., Zhu X., Wu B., Cai X., Wang X., Qian J., Wang X., Jin L. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J. Med. Genet.* 2007;44(7):437-444. DOI 10.1136/jmg.2007.049056

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.02.2024. После доработки 01.07.2024. Принята к публикации 08.07.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-87

Полиморфные варианты генов ферментов антиоксидантной системы, апоптоза и воспаления как потенциальные предикторы инфаркта миокарда

Т.Р. Насибуллин , В.В. Эрдман , Я.Р. Тимашева , И.А. Туктарова , А.А. Петинцева ^{1, 2}, Г.Ф. Корытина 

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

² Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

 nasibullintr@yandex.ru

Аннотация. Инфаркт миокарда (ИМ) – многофакторное полигенное заболевание, развивающееся в результате сложного взаимодействия многочисленных генетических факторов и внешней среды. Соответственно, вклад каждого из них по отдельности, как правило, невелик и может существенно зависеть от состояния других сопутствующих факторов. Цель исследования – поиск информативных предикторов развития ИМ на основе полигенного анализа полиморфных вариантов генов ферментов антиоксидантной защиты – *PON1* (rs662), *PON2* (rs7493), *CAT* (rs1001179), *MSRA* (rs10098474), *GSTP1* (rs1695); апоптоза – *CASP8* (rs3834129), *TP53* (rs1042522), *BCL2* (rs12454712); воспаления *CRP* (rs1205), *CX3CR1* (rs3732378), *IL6* (rs1800795), *CCL2* (rs1024611). В работе использованы образцы: 591 – ДНК (280 больных, перенесших ИМ в возрасте от 30 до 60 лет, средний возраст 46.02 ± 6.17 ; 311 – контроль, возраст от 30 до 62 лет, средний возраст 44.65 ± 7.07). Все участники исследования – мужчины, татары по этнической принадлежности. С помощью логистического регрессионного анализа с учетом различных моделей выявлены ассоциации с ИМ полиморфных вариантов генов *CX3CR1* (rs3732378) (сверхдоминантная модель – G/G+A/A vs A/G $P = 0.0002$, OR = 1.9), *MSRA* (rs10098474) (доминантная модель – T/T vs T/C+C/C $P = 0.015$, OR = 1.51), *CCL2* (rs1024611) (рецессивная модель – $P = 0.0007$ – A/A+A/G vs G/G OR = 2.63), *BCL2* (rs12454712) (лог-аддитивная модель – аллель *C, $P = 0.005$, OR = 1.38). С применением метода Монте-Карло и цепей Маркова (APSampler) получены сочетания аллелей/генотипов изученных полиморфных локусов, ассоциированных с высоким риском ИМ, в составе которых, помимо обнаруженных в ходе анализа ассоциаций ИМ и отдельных полиморфных вариантов, присутствуют полиморфные варианты генов *CASP8*, *TP53*, *CAT*, *PON2*, *CRP*, *IL6*, *GSTP1*. Среди этих сочетаний проведен попарный анализ возможного нелинейного взаимодействия между выявленными комбинациями аллелей/генотипов, который показал синергетические взаимодействия полиморфных вариантов *CX3CR1**A/G и *CASP8**I/I, *MSRA**C и *CRP**C, *CAT**C/T и *MSRA**C, *CAT**C/T и *CX3CR1**A, способствующие развитию ИМ. На основе полученных результатов с использованием многофакторного логистического регрессионного анализа построена предиктивная модель для оценки риска развития ИМ, предсказательная способность которой достигла значения AUC = 0.71 (AUC (area under curve) – площадь под кривой при ROC-анализе).

Ключевые слова: инфаркт миокарда; окислительный стресс; апоптоз; воспаление.

Для цитирования: Насибуллин Т.Р., Эрдман В.В., Тимашева Я.Р., Туктарова И.А., Петинцева А.А., Корытина Г.Ф. Полиморфные варианты генов ферментов антиоксидантной системы, апоптоза и воспаления как потенциальные предикторы инфаркта миокарда. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):792-800. DOI 10.18699/vjgb-24-87

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00179 (<https://rscf.ru/project/24-25-00179/>) с использованием оборудования ЦКП «Биомика» и комплекса оборудования для исследования нуклеиновых кислот «КОДИНК» (УНУ «КОДИНК») (ИБГ УФИЦ РАН).

Polymorphic variants of the genes for enzymes of the antioxidant system, apoptosis and inflammation as potential predictors of myocardial infarction

T.R. Nasibullin , V.V. Erdman , Y.R. Timasheva , I.A. Tuktarova , A.A. Petinseva ^{1, 2}, G.F. Korytina 

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

² Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

 nasibullintr@yandex.ru

Abstract. Myocardial infarction (MI) is a multifactorial polygenic disease that develops as a result of a complex interaction of numerous genetic factors and the external environment. Accordingly, the contribution of each of them separately is usually not large and may significantly depend on the state of other accompanying factors. The purpose of the study was

to search for informative predictors of MI risk based on polygenic analysis of polymorphic variants of (1) the antioxidant defense enzyme genes *PON1* (rs662), *PON2* (rs7493), *CAT* (rs1001179), *MSRA* (rs10098474) and *GSTP1* (rs1695); (2) the apoptosis genes *CASP8* (rs3834129), *TP53* (rs1042522) and *BCL2* (rs12454712); and (3) the inflammation genes *CRP* (rs1205), *CX3CR1* (rs3732378), *IL6* (rs1800795) and *CCL2* (rs1024611). 591 DNA samples were used in the study (280 patients with the onset at 30 to 60 years, with an average age of 46.02 ± 6.17 , and 311 control subjects aged 30 to 62, with an average age of 44.65 ± 7.07). All the participants were male and Tatars by ethnicity. The logistic regression analysis with various models demonstrated associations with MI of polymorphic variants of the genes *CX3CR1* (rs3732378) (overdominant model – G/G + A/A vs A/G $P = 0.0002$, OR = 1.9), *MSRA* (rs10098474) (dominant model – T/T vs T/C + C/C $P = 0.015$, OR = 1.51), *CCL2* (rs1024611) (recessive model – $P = 0.0007$ – A/A + A/G vs G/G OR = 2.63), *BCL2* (rs12454712) (log-additive model – *C allele, $P = 0.005$, OR = 1.38). Using the Monte Carlo method and Markov chains (APSampler), combinations of alleles/genotypes of the studied polymorphic loci associated with a high risk of MI were obtained, which, in addition to those identified during single-locus analysis, contained polymorphic variants of the genes *CASP8*, *TP53*, *CAT*, *PON2*, *CRP*, *IL6*, *GSTP1*. Among the combinations obtained, a pairwise analysis of possible non-linear interactions between the identified combinations of alleles/genotypes was carried out, which showed synergistic interactions of the polymorphic variants *CX3CR1**A/G and *CASP8**I/I, *MSRA**C and *CRP**C, *CAT**C/T and *MSRA**C, *CAT**C/T and *CX3CR1**A contributing to the development of MI. Based on the results obtained using multivariate logistic regression analysis, a predictive model was built to assess the risk of developing MI, the predictive ability of which reached the value AUC = 0.71 (AUC – area under the curve in ROC analysis).

Key words: myocardial infarction; oxidative stress; apoptosis; inflammation.

For citation: Nasibullin T.R., Erdman V.V., Timasheva Y.R., Tuktartova I.A., Petinseva A.A., Korytina G.F. Polymorphic variants of the genes for enzymes of the antioxidant system, apoptosis and inflammation as potential predictors of myocardial infarction. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(7):792-800. DOI 10.18699/vjgb-24-87

Введение

Инфаркт миокарда (ИМ) – один из наиболее тяжелых клинических вариантов ишемической болезни сердца (ИБС) – значительно сокращает продолжительность и качество жизни (Шальнова и др., 2022; Сабгайда и др., 2023). В связи с этим анализ факторов, способствующих развитию ИМ, является важной задачей для профилактики этого заболевания. Отягощенный семейный анамнез относится к основным независимым факторам риска, что подтверждено результатами широкомасштабных проспективных исследований (Colditz et al., 1991; Assmann et al., 2002).

В настоящее время идет активное изучение молекулярно-генетических основ наследственной предрасположенности к ИМ. С помощью полногеномного анализа ассоциаций выявлено значительное количество полиморфных вариантов, связанных с ИБС в целом и ИМ в частности. В то же время отмечается слабая воспроизводимость полученных результатов, кроме того, несмотря на значительные успехи в поиске генетических вариантов, ассоциированных с исследуемой патологией, они не привели к прогрессу в прогнозировании заболевания.

Инфаркт миокарда относится к многофакторным полигенным заболеваниям, развитие которых обусловлено множеством сложно взаимодействующих генетических факторов и факторов внешней среды. Роль отдельных факторов, как правило, невелика, более того, она может существенно варьировать, в зависимости от окружения (Domingo et al., 2019). В связи с этим перспективным направлением представляется анализ ассоциаций сочетаний полиморфных вариантов с изучаемым полигенным признаком. При этом, поскольку увеличение количества элементов, составляющих сочетание, сопровождается экспоненциальным ростом возможных комбинаций и, как следствие, снижением частоты их встречаемости, более рациональным представляется ограничивать количество переменных на основе уже известных данных о патогенезе заболевания либо включать в анализ полиморфные

варианты, которые, по результатам полногеномных исследований, ассоциированы с изучаемым фенотипом.

Известно, что активные формы кислорода, образующиеся в ходе различных окислительно-восстановительных реакций, способны оказывать повреждающее воздействие на клеточные структуры, инициировать окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот (Batty et al., 2022). В зависимости от силы воздействия они могут выступать инициаторами процессов либо воспаления, либо апоптоза, которые играют важную роль в развитии атеросклероза.

Цель настоящего исследования – комплексный анализ полиморфных вариантов генов, ферментов антиоксидантной защиты, воспаления и апоптоза (табл. 1) как потенциальных предикторов риска развития инфаркта миокарда.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК неродственных между собой больных, перенесших крупноочаговый ИМ в возрасте от 30 до 60 лет ($N = 280$, средний возраст 46.02 ± 6.17). Все больные находились на лечении в Республиканском кардиологическом диспансере г. Уфы.

Диагноз ИМ устанавливался на основании критериев АНА/ESC 2012 г. с применением современных инструментальных и биохимических методов, включая ЭКГ в 12 отведениях, эхокардиографию, рентгенографию органов грудной клетки, общий и биохимический анализы крови, определение маркеров некроза миокарда и показателей липидного спектра. Из исследования исключались больные с эндокринной патологией, другими сопутствующими тяжелыми хроническими заболеваниями. Контрольную группу составили неродственные между собой лица в возрасте от 30 до 62 лет ($N = 311$, средний возраст 44.65 ± 7.07) без клинических признаков сердечно-сосудистой патологии. Все участники исследования – мужчины, татары по этнической принадлежности, проживающие в г. Уфе, Республика Башкортостан. Исследование одобрено комитетом по этике Института биохимии и генетики –

Таблица 1. Перечень включенных в исследование полиморфных вариантов и их локализация

Полиморфный маркер	Хромосомная локализация (GRCh38.p14)	Ген, локализация	Продукт гена
rs1205 g.159712443C>T, 2042C>T	1:159712443	<i>CRP</i> 3'-нетранслируемый регион	С-реактивный белок
rs3834129 g.201232809_201232814del, -654(6)I/D	2:201232809-201232814	<i>CASP8</i> промотор	Каспаза 8
rs3732378 g.39265671G>A, c.935C>T, T280M	3:39265671	<i>CX3CR1</i> 2 экзон	Рецептор к фракталкину
rs1800795 g.22727026C>G, -174C>G	7:22727026	<i>IL6</i> промотор	Интерлейкин 6
rs662 g.95308134T>C, c.575A>G, Q192R	7:95308134	<i>PON1</i> 6 экзон	Параоксоназа 1
rs7493 g.95405463G>C, c.932C>G, S311C	7:95405463	<i>PON2</i> 9 экзон	Параоксоназа 2
rs10098474 g.10054107C>T, -410C>T	8:10054107	<i>MSRA</i> промотор	Метионин сульфоксид редуктаза A
rs1001179 g.34438684C>T, -262C>T	11:34438684	<i>CAT</i> промотор	Каталаза
rs1695 g.67585218A>G c.313A>G I105V	11:67585218	<i>GSTP1</i> 5 экзон	Глутатион S трансфераза P1
rs1042522 g.7676154G>C, c.98C>G, P72R	17:7676154	<i>TP53</i> 4 экзон	Транскрипционный фактор p53
rs1024611 g.34252769A>G, -2518A>G	17:34252769	<i>CCL2</i> 5'-конец	Хемокин CCL2
rs12454712 g.63178651T>C	18:63178651	<i>BCL2</i> 2 интрон	Ингибитор апоптоза BCL2

обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (протокол № 14 от 02.12.2010). От всех участников было получено информированное согласие на проведение исследования.

ДНК выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфного варианта rs3834129(*CASP8*) проводили с помощью ПЦР с последующим разделением полученных фрагментов в 7 % полиакриламидном геле. Для анализа остальных полиморфных маркеров использовали аллель-специфичную ПЦР, с последующим анализом полученных фрагментов в 2 % агарозном геле. Подбор праймеров осуществляли с помощью базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) и онлайн-ресурса (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Последовательности праймеров и размеры фрагментов представлены в табл. 2.

Статистический анализ отдельных полиморфных вариантов выполняли с помощью средств языка программирования R и пакета SNPAssoc. Для анализа отклонения

полученных частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга применяли точный тест Фишера. При поиске ассоциаций с заболеванием использовали логистический регрессионный анализ с учетом пяти возможных моделей наследования (кодоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и аддитивной). Лучшую модель выбирали по информационному критерию Акаике. Полиморфный маркер считали ассоциированным с признаком при $P < 0.05$.

Поиск сочетаний аллелей генотипов, ассоциированных с заболеванием, проводили с использованием метода Монте-Карло и цепей Маркова с помощью программного обеспечения APSampler (Favorov et al., 2005). Критериями отбора найденных сочетаний были $P < 0.05$ после процедуры Бенджамини–Хохберга (FDR) и OR < 0.3 (OR – отношение шансов odds ratio) (для протективных маркеров) или OR > 3 (для маркеров повышенного риска).

Для выявления возможного нелинейного взаимодействия (синергии) между двумя элементами найденных

Таблица 2. Последовательности праймеров и размеры амплифицированных фрагментов

Маркер	Праймеры	Аллели (размер фрагментов, п.о.)
rs1205* <i>CRP</i>	F 5'-aga aaa cag ctt gga ctc act ca-3' R 5'-tga gag gac gtg aac ctg gg-3' C 5'-cca gtt tgg ctt ctg tcc tga c-3' T 5'-ttg cca cat gga gag aga cta-3'	BK* (235) *T (195) *C (85)
rs3834129* <i>CASP8</i>	F 5'-ggg ccc cgc tgt taa cat ttt gat-3' R 5'-ccg agg aag gca ctg aga cg-3'	*D (126) *I (132)
rs3732378* <i>CX3CR1</i>	F 5'-tgc tgc tca gaa cac ttc ca-3' R 5'-cct tct ggt ggt cat cgt gt-3' A 5'-caa caa tgg cta aat gca atc a-3' G 5'-ccc tca gtg tga ctg aga c-3'	BK (323) A (163) G (201)
rs1800795* <i>IL6</i>	F 5'-ctt cgt gca tga ctt cag ctt-3' R 5'-gag act cat ggg aaa atc cca ca-3' C 5'-ccc cta gtt gtg tct tgt c-3' G 5'-aat gtg acg tcc ttt agt atc-3'	BK (279) *G (179) *C (139)
rs662* <i>PON1</i>	F 5'-cta gca cga agg ctc cat cc-3' R 5'-cca cta cat ttc aga gag ttc aca-3' G 5'-ccc aaa tac atc tcc cag cat c-3' A 5'-tat ttt ctt gac ccc tac tta ca-3'	BK (351) G (222) A (173)
rs7493* <i>PON2</i>	F 5'-cat gtc ccc tta atc agt gtg-3' R 5'-tga gca gct tcc cat cat aca-3' C 5'-tag tca ctg tag gct tct gag-3' G 5'-ccg cat cca gaa cat tca atg-3'	BK (224) C (152) G (113)
rs10098474* <i>MSRA</i>	F 5'-cct tgct ccc gta ttt tgg c-3' R 5'-cct gtc gta cga agt acg tg-3' C 5'-gtc ctc ttc tat ctt act gag c-3' T 5'-cga ctt cgc agt tta gca gta-3'	BK (337) T (243) C (136)
rs1001179* <i>CAT</i>	F 5'-ata gct atg gag cgc aag gc-3' R 5'-ggc ctg aag acc gga gat ac-3' C 5'-gcc ctg ggt tcg gct atc-3' T 5'-gcc ctg ggt tcg gct att-3'	BK (236) C,T (117)**
rs1695* <i>GSTP1</i>	F 5'-tct cat cct tcc acg cac at-3' R 5'-caa gcc acc tgag ggg taa g-3' A 5'-gtt ggt gta gat gag gga gat-3' G 5'-gac ctc cgc tgc aaa tac g-3'	BK (333) G (132) A (240)
rs1042522* <i>TP53</i>	F 5'-tca ccc atc tac agt ccc cct-3' R 5'-ata cgg cca ggc att gaa gt-3' C 5'-cca gag gct gct ccc gc-3' G 5'-tgg tgc agg ggc ctc cc-3'	BK (345) G (149) C (229)
rs1024611* <i>CCL2</i>	F 5'-cgg gcc cag tat ctg gaa tg-3' R 5'-ctg gaa agt gac ttg gcc ttt g-3' G 5'-gaa agt ctt ctg gaa agt gac-3' A 5'-agt ggg agg cag aca gct a-3'	BK (273) G (201) A (111)
rs12454712* <i>BCL2</i>	F 5'-ctt cct ggt ttc ttt gcc agg-3' R 5'-atc act cct caa agg cgc ag-3' T 5'-gcc cca gac tca ctt gcgt-3' C 5'-ggt gtt gca aca tcc atc acg-3'	BK (306) T (200) C (145)

* BK – внутренний контроль.

** Сначала проводилось тестирование на наличие редкого аллеля *Т, затем при положительном тесте проба тестировалась на наличие аллеля *С.

сочетаний рассчитывали показатель SF (synergy factor) (Cortina-Borja al., 2009). Фактор синергии рассматривался как значимый, если при $P < 0.05$ и значение 95 % CI для SF не пересекало 1. При построении предиктивных моделей (с помощью SPSS v. 22) использовали метод многофакторной логистической регрессии с пошаговым включением переменных, в качестве которых были изученные полиморфные варианты с учетом выбранной оптимальной модели и парные сочетания со значимым показателем SF.

Результаты

Результаты анализа распределения частот генотипов изученных полиморфных вариантов представлены в табл. 3. В контрольной группе все полученные распределения частот генотипов исследованных локусов соответствуют равновесному распределению Харди–Вайнберга.

Анализ ассоциаций полиморфных локусов с ИМ выявил статистически значимые результаты для полиморфных вариантов генов *CX3CR1* (rs3834129), *MSRA* (rs10098474),

Таблица 3. Распределение частот генотипов по изученным полиморфным вариантам и результаты анализа ассоциаций с инфарктом миокарда

Ген, маркер	Генотип	Контроль N (%)	Больные N (%)	P*	Результаты логистического анализа		
					Модель**	P	OR 95 % CI
CRP rs1205	C/C	98 (32.67)	81 (28.93)	0.906	Рецессивная – C/C+C/T vs T/T	0.099	1.4 0.94–2.08
	C/T	146 (48.67)	131 (46.79)				
	T/T	56 (18.67)	68 (24.29)				
CASP8 rs3834129	I/I	124 (39.87)	102 (36.43)	0.47	Доминантная – I/I vs I/D+D/D	0.39	1.16 0.83–1.61
	I/D	140 (45.02)	132 (47.14)				
	D/D	47 (15.11)	46 (16.43)				
CX3CR1 rs3732378	G/G	215 (70.49)	156 (55.71)	0.099	Сверхдоминантная – G/G+A/A vs A/G	0.0002	1.9 1.35–2.67
	A/G	77 (25.25)	112 (40)				
	A/A	13 (4.26)	12 (4.29)				
IL6 rs1800795	C/C	38 (12.54)	26 (9.29)	0.326	Сверхдоминантная – G/G+C/C vs C/G	0.111	1.3 0.94–1.81
	C/G	151 (49.83)	158 (56.43)				
	G/G	114 (37.62)	96 (34.29)				
PON1 rs662	T/T	143 (46.58)	139 (50.18)	0.3	Лог-аддитивная – аллель *C (0, 1, 2)	0.259	0.87 0.68–1.11
	T/C	127 (41.37)	112 (40.43)				
	C/C	37 (12.05)	26 (9.39)				
PON2 rs7493	G/G	136 (44.88)	118 (44.36)	0.52	Рецессивная – G/G+G/C vs C/C	0.326	1.27 0.79–2.06
	G/C	130 (42.9)	108 (40.6)				
	C/C	37 (12.21)	40 (15.04)				
MSRA rs10098474	T/T	152 (50)	106 (39.85)	0.494	Доминантная – T/T vs T/C+C/C	0.015	1.51 1.08–2.11
	T/C	122 (40.13)	133 (50)				
	C/C	30 (9.87)	27 (10.15)				
CAT rs1001179	C/C	207 (70.65)	179 (66.54)	0.138	Лог-аддитивная – аллель *T (0, 1, 2)	0.277	1.18 0.88–1.57
	C/T	74 (25.26)	76 (28.25)				
	T/T	12 (4.1)	14 (5.2)				
GSTP1 rs1695	A/A	142 (48.46)	129 (47.78)	0.343	Рецессивная– A/A+A/G vs G/G	0.209	1.38 0.84–2.27
	A/G	119 (40.61)	102 (37.78)				
	G/G	32 (10.92)	39 (14.44)				
TP53 rs1042522	C/C	155 (50)	134 (53.17)	0.228	Лог-аддитивная – аллель *G (0, 1, 2)	0.405	0.9 0.7–1.16
	C/G	122 (39.35)	95 (37.7)				
	G/G	33 (10.65)	23 (9.13)				
CCL2 rs1024611	A/A	169 (54.34)	131 (46.79)	0.552	Рецессивная – A/A+A/G vs G/G	0.0007	2.63 1.47–4.72
	A/G	124 (39.87)	110 (39.29)				
	G/G	18 (5.79)	39 (13.93)				
BCL2 rs12454712	T/T	119 (38.26)	86 (30.71)	0.72	Лог-аддитивная – аллель *C (0, 1, 2)	0.005	1.38 1.1–1.73
	T/C	144 (46.3)	125 (44.64)				
	C/C	48 (15.43)	69 (24.64)				

* Точный тест на соответствие равновесию Харди–Вайнберга для контрольной группы.
** Модель выбирали по результатам информационного критерия Акаике.

CCL2 (rs1024611) и *BCL2* (rs12454712). Следует отметить, что после введения поправки Бенджамини–Хохберга (множественных сравнений) значимыми остались лишь результаты для генов *CCL2* и *CX3CR1*.
С помощью программного обеспечения APSampler, использующего динамический метод Монте-Карло, нами проведен анализ возможных сочетаний изученных полигенных вариантов, ассоциированных с высоким рис-

ком ИМ. Выявлены сочетания с большими показателями OR и *P*, чем компоненты этих сочетаний (табл. 4). При этом в составе сочетаний встречаются не только варианты генов *CX3CR1*, *MSRA*, *CCL2* и *BCL2*, полученные в ходе анализа отдельных локусов, но и варианты генов *CRP*, *CASP8*, *PON2*, *CAT*, *IL6*, *GSTP1*, *TP53*.
Для выявления возможных нелинейных взаимодействий в обнаруженных сочетаниях мы провели расчет

Таблица 4. Сочетания аллелей/генотипов изученных полиморфных вариантов, ассоциированные с риском развития инфаркта миокарда

Сочетание	Контроль, %	Больные, %	<i>P</i>	<i>P</i> _{FDR}	OR	95 % CI _{OR}
<i>CAT</i> *C/T+ <i>MSRA</i> *C+ <i>CRP</i> *C+ <i>CX3CR1</i> *A	0.34	7.17	5.91×10^{-6}	0.0117	22.48	2.99–169.1
<i>CX3CR1</i> *A/G+ <i>CASP8</i> *I/I	6.89	18.93	8.70×10^{-6}	0.0142	3.16	1.85–5.39
<i>GSTP1</i> *G+ <i>MSRA</i> *C+ <i>CRP</i> *T+ <i>CASP8</i> *I+ <i>IL6</i> *C/G	3.42	13.64	8.88×10^{-6}	0.0141	4.45	2.16–9.17
<i>PON2</i> *G+ <i>CAT</i> *T+ <i>MSRA</i> *C+ <i>CRP</i> *C+ <i>CX3CR1</i> *A	0.69	7.92	9.47×10^{-6}	0.0146	12.39	2.88–53.39
<i>CAT</i> *T+ <i>MSRA</i> *T/C+ <i>CASP8</i> *D+ <i>BCL2</i> *C	1.71	10.19	1.10×10^{-5}	0.0143	6.5	2.47–17.17
<i>MSRA</i> *C+ <i>CX3CR1</i> *A+ <i>TP53</i> *C/C+ <i>IL6</i> *C	2.00	10.71	1.29×10^{-5}	0.0132	5.88	2.39–14.48
<i>CX3CR1</i> *A+ <i>CASP8</i> *I/I+ <i>TP53</i> *C+ <i>IL6</i> *C	0.33	13.10	1.48×10^{-5}	0.0135	4.4	2.12–9.12
<i>PON2</i> *G/G+ <i>MSRA</i> *C+ <i>CX3CR1</i> *A+ <i>IL6</i> *C	1.68	9.77	1.76×10^{-5}	0.014	6.32	2.39–16.72
<i>PON2</i> *G+ <i>CCL2</i> *G/G+ <i>CASP8</i> *D+ <i>IL6</i> *C	1.00	7.89	3.27×10^{-5}	0.016	8.46	2.49–28.69
<i>CRP</i> *T+ <i>CCL2</i> *G/G+ <i>TP53</i> *C	1.34	8.33	6.73×10^{-5}	0.0143	6.7	2.27–19.8
<i>CAT</i> *T+ <i>GSTP1</i> *A/A+ <i>MSRA</i> *C+ <i>CX3CR1</i> *A	0.34	5.70	1×10^{-4}	0.0145	17.6	2.31–134.2

SF-фактора между всеми возможными парами локусов, входящими в состав. В результате анализа было получено пять статистически значимых пар: *CAT**T+*MSRA**C (SF = 2.57, 95 % CI_{SF} 1.23–5.4, Z = 2.50, *P* = 0.01), *CAT**C/T+*CX3CR1**A (SF = 2.45, 95 % CI_{SF} 1.08–5.56, Z = 2.15, *P* = 0.03), *CX3CR1**A/G+*CASP8**I/I (SF = 4.71, 95 % CI_{SF} 2.22–10.01, Z = 4.03, *P* = 5.6×10^{-5}), *CRP**T+*IL6**C/G (SF = 2.42, 95 % CI_{SF} 1.19–4.94, Z = 2.44, *P* = 0.015), *MSRA**C+*CRP**C (SF = 2.56, 95 % CI_{SF} 1.12–5.86, Z = 2.22, *P* = 0.027). Таким образом, результаты дают основание предполагать, что для перечисленных пар наблюдается синергетический эффект.

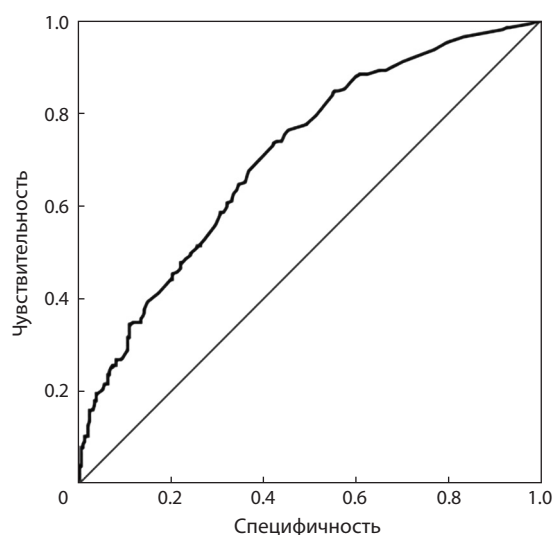
Далее для построения получения прогностической модели развития ИМ был проведен многофакторный логистический регрессионный анализ с пошаговым включением наиболее значимых предикторов (в качестве предикторов выступали отдельные полиморфные варианты, а также выявленные в ходе SF-анализа значимые парные комбинации). Перечень предикторов, вошедших в конечную модель, представлен в табл. 5. Таким образом, нами получена модель для расчета генетического риска развития ИМ, которая, по результатам ROC-анализа, обладает достаточно высокой прогностической эффективностью (AUC = 0.71 $P_{AUC} = 1.7 \times 10^{-16}$) (см. рисунок).

Обсуждение

Основной целью данного исследования было выявление информационно значимых предикторов риска ИМ. Полученные нами результаты свидетельствуют об участии в формировании предрасположенности к ИМ генов, кодирующих белки, участвующие в воспалительном ответе, антиоксидантной защите и апоптозе, что согласуется с современными представлениями об этиопатогенезе ИБС. Действительно, следствие окислительного стресса – процессы перекисного окисления липидов, окисление белков, которые рассматриваются как факторы повреждения эндотелия сосудов, приводящих к активации процессов воспаления или апоптоза. Причем на ранних этапах атерогенеза апоптоз может рассматриваться как протективный фактор, тогда как на более поздних этапах апоптоз

Таблица 5. Коэффициенты уравнения логистической регрессии для многофакторной модели расчета генетического риска развития инфаркта миокарда

Предиктор	B	<i>P</i>	OR	95 % CI _{OR}
<i>CCL2</i> *G/G	1.06	0.0023	2.89	1.46–5.71
<i>BCL2</i> *C (x0.1.2)	0.29	0.0300	1.33	1.03–1.73
<i>MSRA</i> *C+ <i>CRP</i> *C	0.71	0.0009	2.03	1.34–3.08
<i>CRP</i> *T/T	0.71	0.0063	2.04	1.22–3.39
<i>CASP8</i> *D	0.69	0.0028	1.99	1.27–3.12
<i>CX3CR1</i> *G/A+ <i>CASP8</i> *I/I	1.25	0.0003	3.50	1.76–6.95
<i>CRP</i> *T+ <i>IL6</i> *G/C	0.48	0.0172	1.61	1.09–2.38
<i>CAT</i> *C/T+ <i>CX3CR1</i> *A	0.72	0.0388	2.05	1.04–4.03
<i>CAT</i> *T+ <i>MSRA</i> *C	0.76	0.0020	2.15	1.32–3.49
Константа	–1.87	9×10^{-11}	0.15	



ROC-анализ эффективности модели, построенной на основе генетических маркеров индивидуального риска развития инфаркта миокарда.

является фактором дестабилизации атеросклеротической бляшки и активации процессов тромбообразования – непосредственной причины развития инфаркта миокарда.

Фракталин (CX3CL1) через свой рецептор (CX3CR1) на ранних стадиях атерогенеза запускает хемотаксис и адгезию моноцитов в области атеросклеротического повреждения (Schulz et al., 2007). Данный хемокин также оказывает антиапоптотическое действие на гладкомышечные клетки и моноциты, содействует пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, что способствует формированию и росту атеросклеротической бляшки (Liu et al., 2010). rs3732378 в гене *CX3CR1* определяет замену аминокислоты треонина на метионин. В работе (McDermott et al., 2003) показано, что рецептор с 280М (аллель *А) менее эффективно связывается с фракталином, т.е. аллель *А рассматривался в качестве протективного фактора по отношению к атеросклерозу. В то же время если на ранних стадиях атерогенеза снижение активности системы CX3CL1-CX3CR1 тормозит развитие заболевания, то на более поздних стадиях этот же эффект может приводить к апоптозу моноцитов и пенстых клеток, прогрессированию заболевания и тромбозу (Landsman et al., 2009; Van Vré et al., 2012).

Протеаза CASP8 относится к цистеиновым протеазам, запускает каскад реакций, конечный итог которых – апоптоз клетки (Ho, Hawkins, 2005). В работе (Sun et al., 2007) показано, что делеция шести пар нуклеотидов в промоторной области гена *CASP8* (rs3834129) нарушает сайт связывания для стимулирующего протеина (sp1) и снижает транскрипционную активность гена. В этой же работе в опытах *in vivo* продемонстрировано, что вариант делеции 6N связан с более низкой апоптотической реактивностью Т-лимфоцитов при стимуляции раковыми клетками. Исходя из этого, выявленный нами вариант *CX3CR1**G/A+*CASP8**I/I может быть ассоциирован с повышенной апоптотической активностью и дестабилизацией атеросклеротической бляшки. В то же время для носителей аллеля rs3834129*D снижение апоптотической активности на более ранних этапах атерогенеза может способствовать прогрессированию заболевания, что подтверждается результатами исследования данного полиморфного варианта на выборке из русской этнической группы из Новосибирска, где продемонстрирована связь генотипа *D/D с прогрессирующим атеросклерозом (Максимов и др., 2022).

Каталаза относится к группе антиоксидантных ферментов, катализирует разложение образующего в процессах биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород, обеспечивает защиту клеток от повреждения продуктами свободно-радикального окисления. В работе (Yang et al., 2004) показано, что у мышей с ApoE-/- и повышенной экспрессией каталазы наблюдается замедление развития атеросклероза.

Сведения об ассоциации полиморфного варианта rs1001179**CAT* с активностью фермента противоречивы. Так, для американцев европейского происхождения показана прямая корреляция активности каталазы аллелем *С, причем различия в уровне активности каталазы существенно варьируют, в зависимости от уровня употребления фруктов и овощей (Ahn et al., 2006); у итальянцев, больных

хроническим лимфолейкозом, продемонстрировано, что для носителей аллеля *Т характерен более низкий уровень метилирования и более высокий уровень экспрессии гена *CAT* (Galasso et al., 2022). В работе (Ershova et al., 2016) на популяционных выборках из русских и бурят показано, что у носителей генотипа *Т/Т обнаружены более низкие концентрации диеновых конъюгатов, чем у носителей аллеля *С, что дает основания предполагать о большей активности каталазы для лиц с генотипом *Т/Т.

Таким образом, обнаруженное нами сочетание *CAT**С/Т+*CX3CR1**А может быть связано с более высокой активностью каталазы, одним из эффектов которой являются ингибирование пролиферации и индукция апоптоза гладкомышечных клеток сосудов (Brown et al., 1999) со стороны каталазы, и снижением ингибирующего воздействия на апоптоз гладкомышечных клеток со стороны фракталиина и его рецептора.

Метионин сульфоксид редуктаза А (MSRA) катализирует восстановление метионин сульфоксида в исходный метионин. Считается, что снижение активности MSRA приводит к снижению устойчивости клеток к окислительному стрессу. В работе (Xu et al., 2020) показана способность MSRA восстанавливать антиатерогенную функцию окисленных липопротеинов высокой плотности. Ранее нами было установлено, что генотип *Т/Т полиморфного локуса rs10098474 в составе сочетания из полиморфных локусов генов *CAT* (rs1001179) и *GPX1* (rs1050450) чаще встречается среди лиц, достигших возраста старше 90 лет (Эрдман и др., 2021), что соответствует полученным нами результатам о негативном вкладе аллеля *С в формирование наследственной предрасположенности к инфаркту миокарда.

Согласно результатам ряда исследований, генотип *Т/Т полиморфного варианта rs1205 (*CRP*) ассоциирован с более низким пониженным содержанием CRP в плазме крови для европейцев (Kolz et al., 2008), американцев европейского происхождения (Lange et al., 2006), жителей восточной Мексики (Reynoso-Vilalpando et al., 2021). CRP обладает выраженными провоспалительными эффектами: по данным (Pasceri et al., 2000), он стимулирует экспрессию молекул межклеточной адгезии хемокинов. В работе (Fujii et al., 2006) отмечено, что CRP может увеличивать выделение активных форм кислорода и индуцировать апоптоз прогениторных эндотелиальных клеток, что способствует эндотелиальной дисфункции.

В то же время отмечают и противоатерогенные свойства – CRP связывает модифицированные липопротеины низкой плотности (Tabuchi et al., 2007), как следствие, он может предотвращать образование пенстых клеток и ограничивать активацию комплемента. Также продемонстрировано, что CRP ингибирует окисление липопротеинов низкой плотности (Badimon et al., 2018). В полученной нами модели генотип *Т/Т полиморфного варианта rs1205 является фактором риска ИМ, что согласуется с данными о протективных свойствах CRP. Нами было обнаружено также неблагоприятное синергетическое взаимодействие в сочетании *MSRA**С+*CRP**С. Вероятно, аллель *С rs10098474 гена *MSRA* связан со снижением активности фермента и, как следствие, снижением устойчивости клеток к окислительному стрессу, тогда, как уже отмечалось,

что CRP способен увеличивать выделение активных форм кислорода, что может усиливать негативное влияние указанной комбинации.

Проатерогенная роль хемокина CCL2 (MCP1 – одного из основных факторов, обеспечивающих хемотаксис иммунокомпетентных клеток к очагу повреждения), продемонстрирована в работах (Aiello et al., 1999; Ohman et al., 2010). Генотип *G/G rs1024611*CCL2, по данным (McDermott et al., 2005), ассоциирован с повышенным содержанием CCL2 в плазме и ИМ. Связь генотипа CCL2*G/G с повышенным риском ИБС подтверждена результатами метаанализа европейских популяций, тогда как для популяций Азии статистически значимых результатов не получено (Bai et al., 2015).

BCL2 – ингибитор апоптоза, внутриклеточный белок, основной представитель семейства BCL2. Аллель С полиморфного варианта rs12454712 способен связываться с транскрипционным фактором ZNF329, который увеличивает экспрессию гена BCL2 (Dong et al., 2021). Как уже отмечалось, на более поздних стадиях атеросклероза активация апоптоза играет негативную роль. В то же время апоптоз может быть существенным фактором в ограничении гиперплазии интимы при атеросклерозе, кроме того, апоптоз макрофагов может быть фактором чрезмерного ограничения воспалительного ответа (Владимирская и др., 2015).

Заключение

Наши результаты можно рассматривать как промежуточные, поскольку полученная модель носит ограниченную предсказательную способность (что, вероятно, можно компенсировать введением дополнительных предикторов). Кроме того, данная модель нуждается в подтверждении на альтернативных выборках. Тем не менее они дают основание предполагать, что полиморфные варианты rs1205*CRP, rs3732378*CX3CR1, rs1800795*IL6, rs1024611*CCL2, rs3834129*CASP8, rs1042522*TP53, rs12454712*BCL2, rs1001179*CAT, rs10098474*MSRA вносят существенный вклад в формирование наследственной предрасположенности к развитию ИМ. Было продемонстрировано, что выявленные синергетические взаимодействия между генотипами/аллелями в сочетаниях CX3CR1*A/G и CASP8*I/I, MSRA*C и CRP*C, CAT*C/T и MSRA*C, CAT*C/T и CX3CR1*A могут существенно влиять на полученную предсказательную модель. Учет характера этих взаимодействий – предмет для дальнейшего анализа.

Список литературы / References

Владимирская Т.Э., Швед И.А., Демидчик Ю.Е. Значение апоптоза гладкомышечных клеток и макрофагов стенки коронарной артерии в патогенезе атеросклероза. *Изв. Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2015;(3):69-74 [Vladimirskaya T.E., Shved I.A., Demidchik Yu.E. importance of the apoptosis of smooth muscle cells and macrophages of the coronary artery wall in the pathogenesis of atherosclerosis. *Vesni Nacyanal'naj Akademii Navuk Belarusi. Serya Medycynskih Navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*. 2015;(3):69-74 (in Russian)]
Максимов В.Н., Пархоменко О.М., Ложкина Н.Г., Гуражева А.А., Максимова С.В., Иванова А.А. Некоторые молекулярно-генети-

ческие маркеры прогрессирующего атеросклероза у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Атеросклероз*. 2022;18(1):6-13. DOI 10.52727/2078-256X-2022-18-1-6-13
[Maksimov V.N., Parkhomenko O.M., Lozhkina N.G., Gurazheva A.A., Maksimova S.V., Ivanova A.A. Some molecular genetic markers of progressive atherosclerosis in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2022;18(1):6-13. DOI 10.52727/2078-256X-2022-18-1-6-13 (in Russian)]
Сабгайда Т.П., Зубко А.В., Семенов В.Г. Результативность федерального проекта «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями» в контексте предотвратимых причин в городских и сельских поселениях России. *Вопросы управления*. 2023;(2):71-85. DOI 10.22394/2304-3369-2023-2-71-85
[Sabgayda T.P., Zubko A.V., Semyonova V.G. Effectiveness of the Federal project "Fight against cardiovascular diseases" in the context of preventable causes of death in the Russian urban and rural settlements. *Voprosy Upravleniya = Management Issues*. 2023;(2):71-85. DOI 10.22394/2304-3369-2023-2-71-85 (in Russian)]
Шальнова С.А., Драпкина О.М., Куценко В.А., Капустина А.В., Муромцева Г.А., Яровая Е.Б., Баланова Ю.А., Евстифеева С.Е., Имаева А.Э., Шляхто Е.В., Бойцов С.А., Астахова З.Т., Барбараш О.Л., Белова О.А., Гринштейн Ю.И., Ефанов А.Ю., Калачикова О.Н., Кулакова Н.В., Недогода С.В., Ротарь О.П., Трубачева И.А., Черных Т.М. Инфаркт миокарда в популяции некоторых регионов России и его прогностическое значение. *Рос. кардиол. журн*. 2022;27(6):9-19. DOI 10.15829/1560-4071-2022-4952
[Shalnova S.A., Drapkina O.M., Kutsenko V.A., Kapustina A.V., Muromtseva G.A., Yarovaya E.B., Balanova Yu.A., Evstifeeva S.E., Imaeva A.E., Shlyakhto E.V., Boytsov S.A., Astakhova Z.T., Barbarash O.L., Belova O.A., Grinshtein Yu.I., Efanov A.Yu., Kalachikova O.N., Kulakova N.V., Nedogoda S.V., Rotar O.P., Trubacheva I.A., Chernykh T.M. Myocardial infarction in the population of some Russian regions and its prognostic value. *Rossiyskiy Kardiologicheskii Zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2022; 27(6):9-19. DOI 10.15829/1560-4071-2022-4952 (in Russian)]
Эрдман В.В., Туктарова И.А., Данилко К.В., Тимашева Я.Р., Викторова Т.В., Насибуллин Т.Р. Полигенный анализ генетических маркеров долголетия с использованием программы APSampler. В: Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии. Материалы III Всерос. науч. конф. с международным участием. Уфа, 21–23 сентября 2021 г. Уфа: Башкир. гос. ун-т, 2021; 245-250. DOI 10.33184/spbgb-2021-09-21.50
[Erdman V.V., Tuktarova I.A., Danilko K.V., Timasheva Ya.R., Viktorova T.V., Nasibullin T.R. Polygenic analysis of genetic markers of longevity using the APSampler program. Book of papers of Russian conf. "Modern Problems of Biochemistry, Genetics and Biotechnology", 21-23 Sep. 2021. Ufa, Russia, 2021;245-250. DOI 10.33184/spbgb-2021-09-21.50 (in Russian)]
Ahn J., Nowell S., McCann S.E., Yu J., Carter L., Lang N.P., Kadlubar F.F., Ratnasinghe L.D., Ambrosone C.B. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006;15(6):1217-1222. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-06-0104
Aiello R.J., Bourassa P.A.K., Lindsey S., Weng W., Natoli E., Rollins B.J., Milos P.M. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1999;19(6):1518-1525. DOI 10.1161/01.ATV.19.6.1518
Assmann G., Cullen P., Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105(3):310-315. DOI 10.1161/hc0302.102575
Badimon L., Peña E., Arderiu G., Padró T., Slevin M., Vilahur G., Chiva-Blanch G. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis. *Front. Immunol*. 2018;9:430. DOI 10.3389/fimmu.2018.00430
Bai X.Y., Li S., Wang M., Qu X., Hu G., Xu Z., Chen M., He G.-W., Wu H. Association of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)-2518A>G polymorphism with susceptibility to coronary artery di-

- sease: A meta-analysis. *Ann. Hum. Genet.* 2015;79(3):173-187. DOI 10.1111/ahg.12105
- Batty M., Bennett M.R., Yu E. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells.* 2022;11(23):3843. DOI 10.3390/cells11233843
- Brown M.R., Miller F.J. Jr., Li W.G., Ellingson A.N., Mozena J.D., Chatterjee P., Engelhardt J.F., Zwacka R.M., Oberly L.W., Fang X., Spector A.A., Weintraub N.L. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1999;85(6):524-533. DOI 10.1161/01.RES.85.6.524
- Colditz G.A., Rimm E.B., Giovannucci E., Stampfer M.J., Rosner B., Willett W.C. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary artery disease in men. *Am. J. Cardiol.* 1991; 67(11):933-938. DOI 10.1016/0002-9149(91)90163-F
- Cortina-Borja M., Smith A.D., Combarros O., Lehmann D.J. The synergy factor: a statistic to measure interactions in complex diseases. *BMC Res. Notes.* 2009;2(1):105. DOI 10.1186/1756-0500-2-105
- Domingo J., Baeza-Centurion P., Lehner B. The causes and consequences of genetic interactions (epistasis). *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2019;20:433-460. DOI 10.1146/annurev-genom-083118-014857
- Dong S.S., Zhu D.L., Zhou X.R., Rong Y., Zeng M., Chen J.B., Jiang F., Tuo X.M., Feng Z., Yang T.L., Guo Y. An intronic risk SNP rs12454712 for central obesity acts as an allele-specific enhancer to regulate *BCL2* expression. *Diabetes.* 2021;70(8):1679-1688. DOI 10.2337/db20-1151
- Ershova O.A., Bairova T.A., Kolesnikov S.I., Kalyuzhnaya O.V., Darenkaya M.A., Kolesnikova L.I. Oxidative stress and catalase gene. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;161(3):400-403. DOI 10.1007/s10517-016-3424-0
- Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics.* 2005;171(4):2113-2121. DOI 10.1534/genetics.105.048090
- Fujii H., Li S.H., Szmítok P.E., Fedak P.W., Verma S. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(11): 2476-2482. DOI 10.1161/01.ATV.0000242794.65541.02
- Galasso M., Dalla Pozza E., Chignola R., Gambino S., Cavallini C., Quaglia F.M., Lovato O., Dando I., Malpeli G., Krampera M., Donadelli M., Romanelli M.G., Scupoli M.T. The rs1001179 SNP and CpG methylation regulate catalase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cell. Mol. Life Sci.* 2022;79(10):521. DOI 10.1007/s00018-022-04540-7
- Ho P.K., Hawkins C.J. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 2005;272(21):5436-5453. DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.04966.x
- Kolz M., Koenig W., Müller M., Andreani M., Greven S., Illig T., Khuseynova N., Panagiotakos D., Pershagen G., Salomaa V., Sunyer J., Peters A. DNA variants, plasma levels and variability of C-reactive protein in myocardial infarction survivors: results from the AIRGENE study. *Eur. Heart J.* 2008;29(10):1250-1258. DOI 10.1093/eurheartj/ehm442
- Landsman L., Bar-On L., Zernecke A., Kim K.-W., Krauthgamer R., Shagdarsuren E., Lira S.A., Weissman I.L., Weber C., Jung S. CX₃CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood.* 2009;113(4):963-972. DOI 10.1182/blood-2008-07-170787
- Lange L.A., Carlson C.S., Hindorff L.A., Lange E.M., Walston J., Durda J.P., Cushman M., Bis J.C., Zeng D., Lin D., Kuller L.H., Nickerson D.A., Psaty B.M., Tracy R.P., Reiner A.P. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA.* 2006;296(22):2703-2711. DOI 10.1001/jama.296.22.2703
- Liu H., Jiang D., Zhang S., Ou B. Aspirin inhibits fractalkine expression in atherosclerotic plaques and reduces atherosclerosis in ApoE gene knockout mice. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2010;24(1):17-24. DOI 10.1007/s10557-009-6210-7
- McDermott D.H., Fong A.M., Yang Q., Sechler J.M., Cupples L.A., Merrel M.N., Wilson P.W.F., D'Agostino R.B., O'Donnell Ch.J., Patel D.D., Murphy P.M. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J. Clin. Invest.* 2003;111(8): 1241-1250. DOI 10.1172/JCI16790
- McDermott D.H., Yang Q., Kathiresan S., Cupples L.A., Massaro J.M., Keane J.F., Larson M.G., Vasan R.S., Hirschhorn J.N., O'Donnell C.J., Murphy P.M., Benjamin E.J. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2005;112(8):1113-1120. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.543579
- Öhman M.K., Wright A.P., Wickenheiser K.J., Luo W., Russo H.M., Eitzman D.T. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency protects against visceral fat-induced atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30(6):1151-1158. DOI 10.1161/ATVBAHA.110.205914
- Pasceri V., Willerson J.T., Yeh E.T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000; 102:2165-2168. DOI 10.1161/01.CIR.102.18.2165
- Reynoso-Villalpando G.L., Casillas-Munoz F.A., Padilla-Gutiérrez J.R., Sevillano-Collantes C., Moreno-Ruiz I., Del Canizo-Gomez F.J., Valdez-Haro A., Martínez-Fernández E., Valle Y. The genetic variants – 717T>C (rs2794521), 1444G>A (rs1130864), and 1846C>T (rs1205) of *CRP* gene, their haplotypes, and their association with serum CRP levels, acute coronary syndrome, and diabetes in patients from Western Mexico. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2021; 19(3):127-136. DOI 10.1089/met.2020.0080
- Schulz C., Schafer A., Stolla M., Kerstan S., Lorenz M., von Brühl M.L., Schiemann M., Bauersachs J., Gloe T., Busch D.H., Gawaz M., Massberg S. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation.* 2007;116(7):764-773. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.695189
- Sun T., Gao Y., Tan W., Ma S., Shi Y., Yao J., Guo Y., Yang M., Zhang X., Zhang Q., Zeng Ch., Lin D. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers. *Nat. Genet.* 2007;39(5):605-613. DOI 10.1038/ng2030
- Tabuchi M., Inoue K., Usui-Kataoka H., Kobayashi K., Teramoto M., Takasugi K., Shikata K., Yamamura M., Ando K., Nishida K., Kasa-hara J., Kume N., Lopez L.R., Mitsudo K., Nobuyoshi M., Yasuda T., Kita T., Makino H., Matsuura E. The association of C-reactive protein with an oxidative metabolite of LDL and its implication in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 2007;48(4):768-781. DOI 10.1194/jlr.M600414-JLR200
- Van Vré E.A., Ait-Oufella H., Tedgui A., Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32:887-893. DOI 10.1161/ATVBAHA.111.224873
- Xu Y., Li F., Zhao X., Tan C., Wang B., Chen Y., Cao J., Wu D., Yu H. Methionine sulfoxide reductase A attenuates atherosclerosis via repairing dysfunctional HDL in scavenger receptor class B type I deficient mice. *FASEB J.* 2020;34(3):3805-3819. DOI 10.1096/fj.201902429R
- Yang H., Roberts L.J., Shi M.J., Zhou L.C., Ballard B.R., Richardson A., Guo Z.M. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ. Res.* 2004;95:1075-1081. DOI 10.1161/01.RES.0000149564.49410

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.04.2024. После доработки 05.08.2024. Принята к публикации 11.08.2024.

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 (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМЭ 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, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, 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 18.11.2024. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 17.7.
.....

