

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

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

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

В.М. Говорун – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

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

Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)

Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)

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)

И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)

И.Б. Rogozin – канд. биол. наук (США)

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

К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)

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

Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

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

М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)

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

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

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды)

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

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

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

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

В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)

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

Е.А. Долгих – д-р биол. наук (Россия)

Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.Л. Киселев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

В.А. Козлов – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)

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

О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)

И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)

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

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

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

Н.А. Проворов – д-р биол. наук, проф. (Россия)

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

А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)

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

М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)

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

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, 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

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

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

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

Executive Secretary

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

Editorial council

V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

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

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan

G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

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

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

I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil

L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

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

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

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

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

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

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

A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States

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

K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States

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

Editorial board

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

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

T.G. Amstislavskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

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

E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia, Netherlands

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

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

V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany

I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany

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

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

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

N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States

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

M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

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

399

ОТ РЕДАКТОРА

Физиологическая генетика

400

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций

М.А. Клещев, Т.А. Алехина, Л.В. Осадчук

406

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Гендер-специфическое влияние мутации *A^y* у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах

Е.Н. Макарова, Е.И. Денисова, В.В. Кожевникова, А.Е. Кулешова

Молекулярная и клеточная биология

415

ОБЗОР

Взаимосвязь прионов с некодирующими РНК

Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова

425

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Особенности протекания РНК-интерференции матричной металлопротеиназы 1 в эпидермальных кератиноцитах, обработанных интерлейкином 17A

Ю.А. Мозулевцева, А.В. Мезенцев, С.А. Брускин

433

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы

Г.С. Батурина, И.Г. Пальчикова, А.А. Конев, Е.С. Смирнов, Л.Е. Каткова, Е.И. Соленов, И.А. Исаков

438

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Характеристики полисайтов связывания мРНК с мРНК гена *ZFNH3* и его ортологов

А.М. Кондыбаева, А.Т. Акимниязова, С.У. Каменова, А.Т. Иващенко

Медицинская генетика

445

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ассоциация полиморфизма генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз с уровнем гуморального иммунного ответа после вакцинации против клещевого энцефалита

Н.С. Юдин, А.В. Игошин, С.Л. Лутова, Я. Гон, М.И. Воевода, В.А. Белявская

452

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Межлинейные различия по эмоциональным и весовым параметрам у крыс с кататоническим типом реагирования и крыс Вистар

Т.А. Алехина, Р.В. Кожемякина

459

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита

И.К. Байков, Л.А. Емельянова, Л.М. Соколова, Е.М. Карелина, А.Л. Матвеев, И.В. Бабкин, Я.А. Хлусевич, В.Ф. Подгорный, Н.В. Тикунова

Генофонд и селекция растений

468

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Фенетический анализ *Populus nigra*, *P. laurifolia* и *P. ×jrtyschensis* в зоне гибридизации

А.В. Климов, Б.В. Прошкин

476

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Использование межвидовой гибридизации в селекции адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

А.И. Недолужко

484

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Мониторинг генетического разнообразия местных популяций рода *Aegilops* L. флоры Казахстана

Р. Уразалиев, М. Есимбекова, К. Мукин, А. Чиркин, Г. Исмагулова

399

FROM THE EDITOR

Physiological genetics

400

ORIGINAL ARTICLE

Sperm quality in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions

M.A. Kleshchev, T.A. Alekhina, L.V. Osadchuk

406

ORIGINAL ARTICLE

Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice

E.N. Makarova, E.I. Denisova, V.V. Kozhevnikova, A.E. Kuleshova

Molecular and cell biology

415

REVIEW

Interrelation of prions with non-coding RNAs

R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova

425

ORIGINAL ARTICLE

RNAi-mediated silencing of matrix metalloproteinase 1 in epidermal keratinocytes influences the biological effects of interleukin 17A

J.A. Mogulevtseva, A.V. Mezentsev, S.A. Bruskin

433

ORIGINAL ARTICLE

Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants

G.S. Baturina, I.G. Palchikova, A.A. Konev, E.S. Smirnov, L.E. Katkova, E.I. Solenov, I.A. Isakov

438

ORIGINAL ARTICLE

The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *ZFHX3* gene and its orthologs

A.M. Kondybayeva, A.N. Akimniyazova, S.U. Kamenova, A.T. Ivashchenko

Medical genetics

445

ORIGINAL ARTICLE

Association between polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the humoral immune response upon vaccination against tick-borne encephalitis

N.S. Yudin, A.V. Igoshin, S.L. Lutova, Ya. Gon, M.I. Voevoda, V.A. Belyavskaya

452

ORIGINAL ARTICLE

Interstrain differences in emotional and weight indices in GC rats with catatonic response and Wistar rats

T.A. Alekhina, R.V. Kozhemjagina

459

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus

I.K. Baykov, L.A. Emelyanova, L.M. Sokolova, E.M. Karelina, A.L. Matveev, I.V. Babkin, Ya.A. Khlusevich, V.F. Podgornyy, N.V. Tikunova

Plant gene pool and breeding

468

ORIGINAL ARTICLE

Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in the hybridization zone

A.V. Klimov, B.V. Proshkin

476

ORIGINAL ARTICLE

Use of interspecific hybridization in the breeding of adaptive hybrids and sorts of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

A.I. Nedoluzhko

484

ORIGINAL ARTICLE

Monitoring of *Aegilops* L. local species genetic diversity of Kazakhstan's flora

R. Urazaliev, M. Yessimbekova, K. Mukin, A. Chirkin, G. Ismagulova

Уважаемые читатели! Предлагаем вашему вниманию четвертый выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции», который включает результаты исследований в области физиологической и медицинской генетики, молекулярной и клеточной биологии, а также генетических ресурсов растений.

Первая статья раздела «Физиологическая генетика» посвящена вопросам наследственной предрасположенности к кататонии – психопатологическому синдрому, для которого характерны расстройства двигательных функций. На модели крыс с генетической кататонией были выявлены ассоциации кататонических реакций со снижением репродуктивных параметров и уменьшением фертильности взрослых самцов. Неизменный интерес вызывают работы по проблеме ожирения. Молекулярные механизмы, опосредующие влияние материнского ожирения на метаболический фенотип потомства, описаны во второй статье раздела.

Раздел «Молекулярная и клеточная биология» открывает обзор, посвященный прионам, их патологическим и инфекционным свойствам и роли микроРНК в патогенезе прионных болезней. Участие РНК в регуляции экспрессии генов, ответственных за патологические процессы в организме человека, рассматривается в двух других статьях раздела. В одной из них с использованием в качестве экспериментальной модели эпидермальных кератиноцитов человека исследован уровень экспрессии матричных металлопротеиназ. Установлено, что РНК-интерференция металлопротеиназ обладает потенциальным терапевтическим эффектом, который может быть использован при лечении псориаза. В другой статье показаны механизмы регуляции с помощью микроРНК гена-кандидата *ZFHX3*, участвующего в процессах развития инсульта, атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний.

В разделе «Медицинская генетика» обсуждаются актуальные проблемы про-

филактики и лечения клещевого энцефалита – вирусного заболевания, приводящего к неврологическим и психиатрическим осложнениям. На примере группы добровольцев, ранее не проходивших вакцинацию против клещевого энцефалита, коллективом исследователей из Новосибирска был проанализирован полиморфизм регуляторных областей генов, формирующих иммунный ответ. Еще одна статья посвящена разработке препаратов нового поколения на основе химерных антител для эффективной профилактики и терапии вируса клещевого энцефалита.

Известно, что при моделировании заболеваний значительную роль играют генетические модели. В этом же разделе приведены результаты изучения линии крыс с генетической кататонией, прошедших длительный процесс селекции. «Кататоническая» структура поведения особей была подтверждена на основании наследственных реакции каталепсии в покое и при стрессе.

Традиционная рубрика «Генофонд и селекция растений» включает три публикации. Авторы двух первых статей рассматривают вопросы интрогрессивной гибридизации у тополя и хризантемы. Проведена оценка эндогенной, межпопуляционной и внутрипопуляционной изменчивости по фенотипическим признакам в зоне естественной гибридизации тополей, распространенных в западносибирском регионе. У всех изученных видов уровень внутрипопуляционного разнообразия оказался значительно выше межпопуляционного. Полученные результаты свидетельствуют также о резком снижении межпопуляционной изменчивости под влиянием естественного отбора на ранних стадиях онтогенеза. В работе по созданию нового селекционного материала хризантемы садовой с использованием природного генофонда рода *Chrysanthemum* предложена стратегия получения отечественных адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой с помощью межвидовой гибридизации. Рубрику завершает статья, которая знакомит с генетическим разнообразием местных экотипов рода *Aegilops*, распространенных на территории Казахстана. Проведен скрининг казахстанских местных популяций и идентифицированы образцы, которые могут быть использованы в качестве источников скороспелости и устойчивости к болезням.

В 2018 году Вавиловский журнал генетики и селекции/Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii был включен в четвертую базу WoS Core Collection – Emerging Sources Citation Index (ESCI). Импакт-фактор для статей, включенных в базу ESCI, не рассчитывается. Нахождение журнала в международных базах данных повышает его видимость и цитируемость. Таким образом, при условии хорошей цитируемости журнал становится кандидатом для отбора в первую базу данных WoS Core Collection – Science Citation Index Expanded.

Академик В.К. Шумный

Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций

М.А. Клещев , Т.А. Алехина, Л.В. Осадчук

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

Кататония – психопатологический синдром, проявляющийся как двигательные расстройства. Кататонический синдром сопутствует многим психическим заболеваниям, в частности шизофрении и депрессии, которые широко распространены в популяции человека. Линия крыс ГК (генетическая кататония) получена из линии Вистар путем длительной (78 поколений) селекции на кататонический тип реагирования и служит моделью шизофренических и депрессивных состояний у человека. Известно, что селекция по поведению, в том числе по выраженности кататонической реакции, приводит к нейроэндокринным, репродуктивным и морфологическим изменениям у животных. Однако влияние отбора по выраженности кататонической реакции на сперматогенную функцию семенников у самцов крыс не изучалось. Целью настоящей работы было провести сравнительное исследование сперматогенной функции семенников у крыс линии ГК и линии Вистар в период полового созревания (50-й день жизни) и у взрослых животных (90-й день жизни). Определяли количество эпидидимальных сперматозоидов, долю половых клеток с прогрессивным движением, долю морфологически аномальных сперматозоидов, а также массу репродуктивных органов и размер помета. У взрослых крыс линии ГК количество сперматозоидов и их подвижность, масса тела, семенников и каудальных эпидидимисов, количество рожденных потомков были снижены по сравнению с крысами линии Вистар. В период полового созревания крысы линии ГК характеризовались большим количеством сперматозоидов по сравнению с линией Вистар. Межлинейных различий по доле морфологических аномалий сперматозоидов у самцов крыс не отмечено. Предполагается, что изменения сперматогенных показателей при селекции крыс на выраженность кататонической реакции обусловлены нарушением онтогенетического паттерна секреции тестостерона. Таким образом, наследственная предрасположенность к проявлению кататонических реакций может быть ассоциирована с ухудшением сперматогенных параметров половозрелых самцов крыс. Линия крыс ГК может являться перспективной моделью для исследования взаимосвязи между наследственной предрасположенностью к кататонии и сперматогенезом.

Ключевые слова: кататония; селекционная модель; крысы; количество сперматозоидов; подвижность сперматозоидов; морфология сперматозоидов; фертильность; световая микроскопия; половое созревание.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Клещев М.А., Алехина Т.А., Осадчук Л.В. Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):400-405. DOI 10.18699/VJ18.375

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kleshchev M.A., Alekhina T.A., Osadchuk L.V. Sperm quality in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):400-405. DOI 10.18699/VJ18.375 (in Russian)

Sperm quality in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions

M.A. Kleshchev , T.A. Alekhina, L.V. Osadchuk

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Catatonia is a psychopathological syndrome displayed as a motor disorder. Catatonia is a sign of many mental disorders, particularly schizophrenia and depression, with a wide distribution in the human population. The GC ("genetic" and "catatonia") rat strain was obtained from the Wistar rat strain by a long selection (78 generations) for the catatonic type of reaction and is a model of schizophrenic and depressive disorders in humans. It is known that selection for behavior including catatonic reactions results in neuroendocrine, reproductive and morphological changes in animals. However, the influence of selection for a catatonic reaction on the spermatogenic function of testes had not been studied. The aim of this study was to conduct a comparative investigation of sperm quality in rats of the GC and the Wistar strain. The epididymal sperm parameters (sperm count, sperm motility, sperm morphology) were measured, and body, testes and epididymal weight were determined at puberty (50 day of life) and at adulthood (90 day of life). The litter size of the GC and Wistar rats was determined. It was found that adult GC rats had a lower sperm count, sperm motility, testis weight, epididymal weight and litter size compared to adult Wistar rats. However, at puberty, GC rats had a higher sperm count than the Wistar strain. Interstrain differences in sperm morphology were not found. It has been assumed that the changes of spermatogenic parameters in response to selection for catatonia are caused by changing the ontogenic pattern of testosterone secretion. In conclusion, the hereditary predisposition to catatonic reaction is associated with impaired sperm parameters in adult rats that reduces their chance to reproduction. The GC rat strain can be a perspective model for investigation of the relationship between the hereditary predisposition to catatonia and spermatogenesis.

Key words: catatonia; selection model; sperm count; sperm motility; sperm morphology; fertility; light microscopy; puberty; rat.

Кататония – распространенный психопатологический синдром, к основным проявлениям которого относятся двигательные расстройства: ступор, каталепсия, стереотипия и некоторые другие (Wilcox, Duffy, 2015). На сегодняшний день считается, что кататонические реакции характерны для аффективных расстройств, шизофренических психозов и посттравматических состояний (Daniels, 2009). В начале 1980-х гг. из популяции крыс аутбредной линии Вистар была селекционирована линия крыс ГК (генетическая кататония). Селекция велась на частоту, выраженность и длительность каталептического застывания, которое вызывали, прижимая крысу с помощью палочки спиной к углу клетки. В дальнейшем линия крыс ГК стала моделью шизофренических (Kolpakov et al., 1986), депрессивных (Kulikov et al., 2006) и невротических симптомов (Рязанова и др., 2012), наблюдаемых у человека.

Известно, что после длительной селекции по поведению наследуется отбираемый признак и коррелятивно изменяются неспецифические функции – стрессорная и половая (Беляев, 1962). На основании многочисленных экспериментальных данных, полученных при доместикации животных, Д.К. Беляевым была выдвинута концепция дестабилизирующего отбора, согласно которой селекция на поведенческие признаки сопряжена с изменением нейрогормональных систем, регулирующих онтогенез особи (Беляев, 1981). В ряде исследований установлено, что при селекции крыс на выраженность кататонической реакции, так же как и при доместикации животных, происходила дестабилизация регуляторных систем онтогенеза, которая выражалась в появлении новых морфологических признаков и изменении нейроэндокринных систем, контролируемых в том числе репродуктивную функцию (Алехина и др., 2016). У крыс отмечалось снижение содержания в гипоталамусе важнейших нейротрансмиттеров – дофамина, норадреналина и серотонина (Алехина и др., 2006). Кроме того, установлено более низкое содержание тестостерона в плазме крови у взрослых крыс кататонической линии в 20-м и 50-м поколениях селекции по сравнению с первым поколением и материнской линией Вистар (Шульга и др., 1996). У самок крыс линии ГК было обнаружено уменьшение общего числа фолликулов в проэструсе и диэструсе в 3-месячном возрасте, более низкая частота эструсов и диэструсов в возрасте 6–12 месяцев, а также повышенный уровень синхронизации эстральной цикличности при групповом содержании по сравнению с крысами исходной линии Вистар (Алехина и др., 2015).

Вызванные отбором на выраженность кататонической реакции изменения в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси могут оказывать влияние и на сперматогенную функцию семенников самцов крыс. Особенно важен для онтогенетического становления и регуляции как сперматогенеза, так и поведения тестостерон. Секретция тестостерона относительно высока в первые сутки после родов, но затем снижается и начинает вновь увеличиваться в начале полового созревания (Chen et al., 2015). Увеличение секреции тестостерона в перинатальный период и во время полового созревания оказывает программирующий эффект на развитие мозговых структур, контролирующего поведение (Trainor et al., 2009), а также необходимо для развития клеток Сертоли и становления сперматогенеза

(Hazra et al., 2013). Ранее было установлено смещение перинатального пика тестостерона у крыс линии ГК на более поздние сроки онтогенеза по сравнению с крысами Вистар (Осадчук, Алехина, 2018). Это может оказать влияние на пролиферацию и дифференциацию клеток Сертоли и, следовательно, привести к изменениям в качестве и количестве сперматозоидов. Однако, несмотря на значительный объем полученных данных о морфологических, нейроэндокринных и репродуктивных изменениях у крыс линии ГК, влияние отбора по выраженности кататонической реакции на количество и качество сперматозоидов у самцов крыс не изучалось.

Исследование сперматогенной функции семенников у крыс линии ГК может помочь в понимании механизмов взаимосвязи наследственной предрасположенности к проявлению кататонических реакций и сперматогенеза. Изучение этих механизмов является актуальной проблемой, поскольку количество и качество сперматозоидов во многом определяют шансы самцов на воспроизводство потомства. Поэтому возможное ухудшение сперматогенных параметров у самцов, генетически предрасположенных к развитию патологических поведенческих реакций, в частности кататонии, может быть важным механизмом, устраняющим таких самцов из размножения в естественной популяции животных, и таким образом вносить вклад в стабилизирующий отбор по поведению. Кроме того, данные исследования имеют прикладное значение, поскольку шизофрения и депрессия, моделью которых служит линия крыс ГК, широко распространены в человеческой популяции. В ряде исследований установлено снижение репродуктивного потенциала и ухудшение качества эякулята у мужчин, страдающих депрессией и шизофренией (Worly, Gur, 2015). Механизмы этого феномена на данный момент неизвестны, вероятно, они могут включать наследственный компонент.

Целью настоящего исследования было изучить влияние длительной селекции по выраженности кататонической реакции на сперматогенную функцию семенников у самцов крыс во взрослом возрасте и в период полового созревания, который является критическим для онтогенетического становления сперматогенеза. Для этого было проведено сравнительное исследование количества эпидидимальных сперматозоидов, подвижности и морфологии половых клеток у самцов крыс линии ГК (78-е поколение селекции) и исходной линии Вистар у половозрелых и пубертатных животных. Чтобы более полно охарактеризовать влияние нейроэндокринных изменений, вызванных селекцией по поведению на развитие половой системы самцов и фертильность животных, мы оценивали также массу тела, репродуктивных органов и размер помета у крыс линий ГК и Вистар.

Материал и методы

Животные. В работе использовали крыс инбредной линии ГК и исходной аутбредной линии Вистар. Животных содержали группами по 5–6 особей в условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН в стандартных пластиковых клетках размером 60×40×20 см с крышкой из металлических прутьев, при естественном фотопериоде. Вода и пища (гранули-

рованный полнорационный апатогенный корм «Чара», Россия) предоставлялись животным без ограничения. При рождении потомства записывали количество рожденных крысят в каждом помете. Забой животных производился в феврале. Для снятия эффектов группового содержания за четверо суток до забоя крыс рассаживали в индивидуальные клетки, аналогичные тем, в которых их содержали ранее.

Принято считать, что у крыс половое созревание начинается с 30–35 дня жизни, а заканчивается в возрасте 55–60 дней, когда появляется способность к фертильным спариваниям (Ojeda, Urbanski, 1994). Исследование проводили на крысах в возрасте 50 дней (период полового созревания) и 90 дней (взрослые животные). В обеих возрастных точках исследовали по 10 крыс каждой линии. Все экспериментальные процедуры выполнены с соблюдением правил, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/669/ЕЕС) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных целей.

Исследование эпидидимальных сперматозоидов. Крыс предварительно обрабатывали диэтиловым эфиром в течение 5 мин, взвешивали, а затем декапитировали. Немедленно после забоя выделяли и взвешивали семенники и каудальные эпидидимисы. У крыс в возрасте 50 дней оба каудальных эпидидимиса помещали в 1 мл фосфатного буфера для дальнейшей оценки количества эпидидимальных сперматозоидов и их морфологии. Из-за очень низкого числа эпидидимальных сперматозоидов и, соответственно, низкой их концентрации в суспензии у крыс в возрасте 50 дней подвижность сперматозоидов не оценивали. У взрослых крыс один эпидидимис помещали в 3 мл фосфатного буфера для оценки количества и морфологии сперматозоидов, а второй – в 1 мл культуральной среды DMEM (Gibco, США) для последующей оценки доли подвижных сперматозоидов. Эпидидимисы выбирались случайным образом. Эпидидимальную ткань измельчали ножницами, встряхивали на шейкере в течение 10 мин и фильтровали через пластиковые фильтры Falcon (диаметр сетки 70 мкм). Используя анализатор фертильности спермы SFA-500 (НПФ «Биола», Россия), оценивали долю сперматозоидов с прогрессивным движением. Измерения проводили при постоянной температуре культуральной среды (37 °C). Количество сперматозоидов подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом при увеличении $\times 200$, после окраски 1 % водным раствором эозина. Результаты пересчитывали на оба каудальных эпидидимиса. Для подсчета морфологически аномальных сперматозоидов аликвоту суспензии сперматозоидов помещали на предметное стекло и делали мазок. Мазки фиксировали метанолом в течение 1 мин и окрашивали с помощью набора красителей Diff-Quick («Абрис+», Россия). Количество аномальных сперматозоидов подсчитывали под световым микроскопом при увеличении $\times 400$. Сперматозоид считали морфологически аномальным, если хотя бы одна из его частей (головка, средняя часть или хвост) имела видимые в световой микроскоп нарушения строения, такие как аморфная головка, аномалии строения крючка, закрученный или шпилькообразный хвост и некоторые другие (Seed et al., 1996).

Статистический анализ данных выполняли с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0. Для данных, имеющих нормальное распределение (вес тела и семенников, доля подвижных сперматозоидов), проводили двухфакторный и однофакторный дисперсионный анализ (главные факторы – генотип и возраст). Для сравнения групп в рамках дисперсионного анализа использовали тест Дункана. Для данных, имеющих распределение, отличающееся от нормального (вес эпидидимисов, количество эпидидимальных сперматозоидов и доля аномальных сперматозоидов), группы сравнивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в статье как средняя выборочная и ее ошибка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

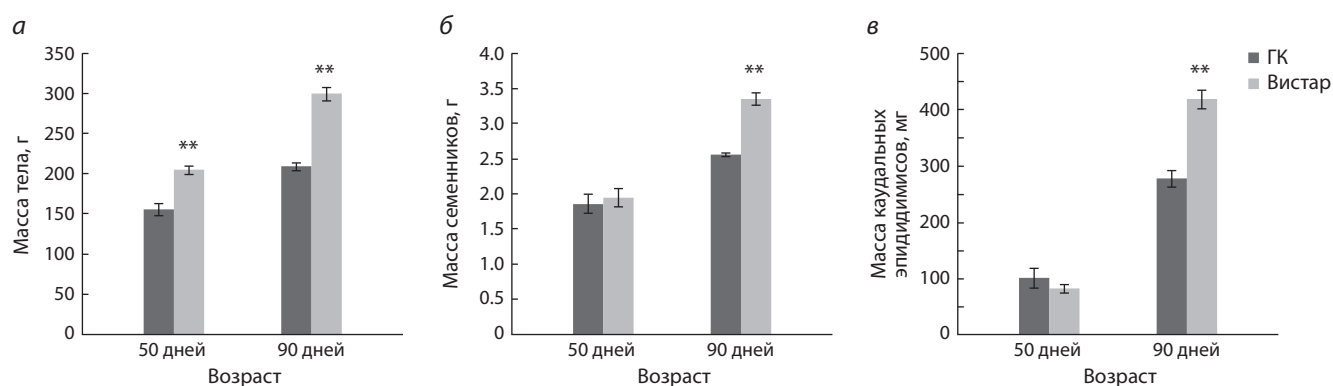
За период исследования отслежен 81 случай рождения крысят обеих линий. В расчете на один помет родилось больше особей в популяции Вистар, чем в линии ГК ($10.2 \pm 0.3, n = 43$; $8.6 \pm 0.3, n = 38$; $p < 0.05$ соответственно).

Двухфакторный дисперсионный анализ позволил установить достоверное влияние возраста ($F_{1,36} = 115.77, p < 0.01$) и генотипа ($F_{1,36} = 106.49, p < 0.01$) на массу тела самцов крыс (рисунок, а). Кроме того, наблюдалось достоверное взаимодействие факторов ($F_{1,36} = 9.50, p < 0.05$). Масса тела крыс линии ГК была достоверно меньше, чем у крыс линии Вистар, как в начале полового созревания, так и в возрасте 90 дней ($p < 0.01$, тест Дункана). Масса тела самцов крыс обеих линий достоверно увеличивалась с возрастом ($p < 0.01$, тест Дункана), но крысы линии Вистар быстрее набирали массу по сравнению с крысами линии ГК.

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние возраста ($F_{1,36} = 84.07, p < 0.01$) и генотипа ($F_{1,36} = 15.49, p < 0.01$) на массу семенников крыс (см. рисунок, б). Установлено также достоверное взаимодействие факторов генотипа и возраста ($F_{1,36} = 9.38, p < 0.05$). Масса семенников достоверно увеличивалась с возрастом как у крыс линии Вистар ($p < 0.01$, тест Дункана), так и у крыс линии ГК ($p < 0.01$, тест Дункана). В возрасте 90 дней масса семенников крыс линии Вистар была достоверно выше, чем крыс линии ГК того же возраста ($p < 0.01$, тест Дункана). В период полового созревания (50-й день жизни) межлинейных различий по массе семенников не наблюдалось.

Масса каудальных эпидидимисов (см. рисунок, в) крыс обеих линий достоверно увеличивалась с возрастом ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). В возрасте 90 дней масса каудальных эпидидимисов у крыс линии Вистар достоверно превышала этот показатель у крыс линии ГК ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). На 50-й день жизни межлинейных различий по массе каудальных эпидидимисов не отмечено.

На 50-й день жизни сперматозоиды в каудальных эпидидимисах отмечались у всех крыс. Число сперматозоидов достоверно увеличивалось с возрастом ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни) у крыс обеих линий (см. таблицу). В период полового созревания число эпидидимальных сперматозоидов у крыс линии ГК достоверно превышало



Масса тела (а), семенников (б) и каудальных эпидидимисов (в) у самцов крыс линий Вистар и ГК на 50-й и 90-й день жизни.

** Достоверность межлинейных различий, $p < 0.01$.

Число эпидидимальных сперматозоидов и доля аномальных сперматозоидов у самцов крыс линий ГК и Вистар в зависимости от возраста

Показатель	50-й день жизни		90-й день жизни	
	ГК	Вистар	ГК	Вистар
Число сперматозоидов в обоих каудальных эпидидимисах, млн	5.14 ± 2.25	$0.04 \pm 0.01^{**}$	71.46 ± 5.14	$110.73 \pm 4.34^{**}$
Доля аномальных сперматозоидов, %	57.35 ± 12.39	77.85 ± 7.48	3.87 ± 0.45	4.11 ± 0.62

** Межлинейные различия самцов одного возраста значимы при $p < 0.01$.

этот показатель у крыс линии Вистар ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). На 90-й день жизни число сперматозоидов у крыс линии ГК было достоверно ниже, чем у крыс линии Вистар ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни).

Доля аномальных сперматозоидов (см. таблицу) у самцов крыс обеих линий достоверно снижалась с возрастом ($p < 0.01$, тест Манна–Уитни). Достоверных межлинейных различий по данному показателю не установлено как в период полового созревания, так и у взрослых животных.

Однофакторный дисперсионный анализ позволил установить влияние генотипа на долю подвижных сперматозоидов у взрослых самцов крыс ($F_{1,18} = 4.52$, $p < 0.05$). Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов у крыс линии Вистар (58.07 ± 8.09 %) была достоверно ($p < 0.05$, тест Дункана) выше, чем у крыс линии ГК (37.36 ± 5.41 %).

Обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что взрослые самцы линии ГК обладают по сравнению с самцами исходной линии Вистар сниженной массой тела, семенников и каудальных эпидидимисов, более низким количеством сперматозоидов и уменьшенной долей подвижных сперматозоидов. Кроме того, у крыс линии ГК отмечалось уменьшение размера помета по сравнению с крысами исходной линии Вистар. Таким образом, длительный (в течение 78 поколений) отбор крыс на проявление кататонической реакции привел к координированному снижению целого комплекса репродуктивных параметров у взрослых самцов и уменьшению фертильности крыс. В некоторых работах отмечается, что у людей, страдающих психическими отклонениями, в частности шизофре-

нией и депрессией, ослаблены сперматогенная (Worly, Gur, 2015) и гормональная (Markham, 2012) функции семенников, а также снижена демографическая фертильность (Terzian et al., 2006). Эти эффекты авторы связывают с негативным влиянием социальной среды или воздействием препаратов, используемых для коррекции поведения. Результаты нашего исследования на модели ГК показывают, что генетическая предрасположенность к кататоническим реакциям сама по себе может быть ассоциирована со снижением количества и подвижности сперматозоидов, а также уменьшением плодовитости, однако механизмы данной ассоциации в настоящее время не ясны.

Нами установлено, что сниженное количество эпидидимальных сперматозоидов у взрослых самцов крыс линии ГК ассоциировано с более низкой массой семенников. Масса семенников и продукция сперматозоидов у взрослых животных во многом определяются числом клеток Сертоли – соматических клеток семенника, каждая из которых способна обеспечить развитие строго определенного числа половых клеток (Sharpe et al., 2003). Поэтому можно предположить, что сниженное количество сперматозоидов у взрослых самцов линии ГК связано с меньшим количеством клеток Сертоли у самцов этой линии по сравнению с самцами линии Вистар.

У крыс дефинитивная (взрослая) популяция клеток Сертоли формируется до 15-дневного возраста (Sharpe et al., 2003). Затем клетки Сертоли теряют пролиферативную активность, дифференцируются и начинают формировать гематотестикулярный барьер, необходимый для поддержания сперматогенеза. Пролиферация, созревание клеток Сертоли и инициация сперматогенеза находятся под конт-

ролем ряда цитокинов, ростовых факторов и гормонов, в частности тестостерона (Escott et al., 2014).

В норме уровень тестостерона у самцов крыс относительно высокий сразу после рождения животного, но резко уменьшается в течение первых суток (Chen et al., 2015), а затем снова увеличивается уже в период полового созревания. С другой стороны, экспрессия генов андрогенового рецептора (AR) на клетках Сертоли начинается только с 5-го дня жизни и достигает дефинитивного уровня на 21-й день (You, Sar, 1998). Предполагают, что временная разобщенность перинатального пика тестостерона и экспрессии AR важна для защиты клеток Сертоли от преждевременного созревания и остановки пролиферации, которая интенсивно идет в первые несколько суток после родов. Это связано с тем, что тестостерон тормозит пролиферацию клеток Сертоли, стимулирует их дифференцировку, формирование битестикулярного барьера и начало сперматогенеза (Escott et al., 2014). Мутантные мыши TgSCAR, для которых характерна преждевременная обильная экспрессия андрогенового рецептора на клетках Сертоли, характеризуются более ранним началом сперматогенеза, но и меньшим размером семенников во взрослом возрасте по сравнению с мышами дикого типа (Nazra et al., 2013).

Учитывая эти данные, можно предположить, что смещение перинатального пика тестостерона на более поздние сроки (7–10-й день жизни), наблюдаемое у крыс линии ГК (Осадчук, Алехина, 2018), может приводить к воздействию тестостерона на андрогеновые рецепторы, которые к этому времени уже начинают экспрессироваться на клетках Сертоли. Это в свою очередь служит причиной более ранней остановки пролиферации клеток Сертоли, более раннего их созревания и обуславливает относительно раннее начало сперматогенеза у крыс линии ГК по сравнению с крысами исходной линии Вистар. Об этом может свидетельствовать большее количество эпидидимальных сперматозоидов у крыс линии ГК по сравнению с крысами линии Вистар в период полового созревания. Однако число клеток Сертоли у крыс линии ГК меньше, чем у крыс линии Вистар, вследствие преждевременной остановки их пролиферации, и, соответственно, количество сперматозоидов у взрослых крыс ГК также снижено. Безусловно, данное предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Кроме того, уменьшение подвижности и количества сперматозоидов у крыс линии ГК может быть обусловлено относительно высоким уровнем кортикостерона в их крови (Алехина и др., 2016). Можно предположить, что повышенная реактивность нервной системы, характерная для крыс линии ГК на данном этапе селекции, обуславливает выраженную реакцию стресса на повседневные процедуры по уходу за животными в виварии, что вызывает повышение секреции кортикостерона. Постоянно высокая активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси может подавлять тестикулярную функцию (Ren et al., 2010; Toufexis et al., 2014) и приводить к снижению количества и подвижности сперматозоидов у крыс линии ГК.

В нашем исследовании установлено, что доля аномальных сперматозоидов у крыс линии ГК не отличалась от таковой у крыс исходной линии Вистар в оба изученных

периода онтогенеза. Полученные результаты показывают, что селекция крыс на предрасположенность к кататоническим реакциям, вероятно, не затрагивает регуляторные системы, контролирующие молекулярные процессы, которые предопределяют формирование морфологически нормального сперматозоида. Содержание морфологически нормальных сперматозоидов в сперме является важнейшим показателем, определяющим ее оплодотворяющую способность (Cooper et al., 2010), так как только такие половые клетки способны к оплодотворению. Поэтому нормальное протекание процессов морфологической дифференцировки сперматид у самцов крыс линии ГК может вносить существенный вклад в сохранение способности к размножению самцов этой линии.

Таким образом, генетическая предрасположенность к проявлению кататонических реакций у крыс линии ГК ассоциирована с ухудшением сперматогенных параметров, причем данная взаимосвязь модулирована возрастом животных. Поэтому линия крыс ГК может служить перспективной моделью для исследования взаимосвязи между кататоническим поведением самца и становлением его тестикулярной функции в онтогенезе.

Благодарности

Работа выполнена по государственному заданию «Клеточные и молекулярно-генетические механизмы контроля адаптивных и патологических процессов у человека и животных» (№ 0324-2018-0016), поддержана грантом РФФИ (№ 17-04-01631). Разведение селекционируемых линий животных осуществлялось в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» (проект № RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Алехина Т.А., Петрова Г.В., Барыкина Н.Н., Прокудина О.И., Чугуй В.Ф., Сахаров Д.Г., Колпаков В.Г. Изменения нейроэндокринологической системы у крыс каталептической линии ГК. Влияние онтогенеза и числа поколений селекции. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2006;92(4):499-505. [Alekhina T.A., Petrova G.V., Barykina N.N., Prokudina O.I., Chugui V.F., Sakharov D.G., Kolpakov V.G. Some neuroendocrinological changes in rats of cataleptic strain GC. Influences of ontogenesis and generation of breeding. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = *I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2006;92(4):499-505. (in Russian)]
- Алехина Т.А., Клочков Д.В., Пальчикова Н.А., Кузьминова О.И., Прокудина О.И. Синхронизация эстрального цикла на фоне состояния повышенной возбудимости крыс, селектированных по кататоническому типу реагирования. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2015;159(1):83-86. DOI 10.1007/s10517-015-2893-x. [Alekhina T.A., Klochkov D.V., Pal'chikova N.A., Kuz'minova O.I., Prokudina O.I. Synchronization of the estrous cycle against the background of increased excitability in rats selected for catatonic type of reaction. *Byulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;159(1):83-86. DOI 10.1007/s10517-015-2893-x. (in Russian)]
- Алехина Т.А., Пальчикова Н.А., Кожемякина Р.В., Прокудина О.И. Признаки дестабилизации при отборе на кататонию, проявляющиеся в изменении поведенческих и соматовегетативных параметров у крыс. *Вавиловский журнал генетики и селекции*.

- 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103. [Alekhina T.A., Palchikova N.A., Kozhemyakina R.V., Prokudina O.I. Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103. (in Russian)]
- Беляев Д.К. О некоторых проблемах коррелятивной изменчивости и их значениях для теории эволюции и селекции животных. Изв. СО АН СССР. 1962;10:111-124. [Belyaev D.K. Some problems of correlative variability and their significance for the theory of evolution and selection of animals. *Izvestiya SO AN SSSR = Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences*. 1962;10:111-124. (in Russian)]
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор domestикации. В кн.: Генетика и благосостояние человечества. М.: Наука, 1981;53-66. [Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor of domestication. In: *Genetics and Humanity Well-being*. Moscow: Nauka Publ., 1981;53-66. (in Russian)]
- Осадчук Л.В., Алехина Т.А. Гормональный и метаболический профиль в онтогенезе у самцов крыс при селекции на кататонический тип реагирования. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2018;54(1):52-59. [Osadchuk L.V., Alekhina T.A. Developmental profiles of hormonal and metabolic parameters in male rats selected for catatonic type of response. *Zhurnal Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii* = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2018;54(1):52-59. (in Russian)]
- Рязанова М.А., Игонина Т.Н., Алехина Т.А., Прокудина О.И. Увеличение доли «нервных» животных в ходе селекции на кататонию: участие в кататонических реакциях центральных адreno-рецепторов. Генетика. 2012;48(11):1328-1335. [Ryazanova M.A., Igonina T.N., Alekhina T.A., Prokudina O.I. The increase in the proportion of nervous animals bred for catatonia: the participation of central adrenoreceptors in catatonic reactions. *Russ. J. Genetics* (Moscow). 2012;48(11):1141-1147.]
- Шульга В.А., Барыкина Н.Н., Алехина Т.А., Колпаков В.Г. Некоторые физиологические характеристики генетической предрасположенности к каталепсии у крыс в зависимости от стадии селекции. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1996;82(10-11):77-83. [Shul'ga V.A., Barykina N.N., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Some physiological characteristics of genetic predisposition to catalepsy. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova* = I.M. Sechenov Physiological Journal. 1996;82(10-11):77-83. (in Russian)]
- Chen L., Wang R., Wang W., Lu W., Xiao Y., Wang D., Dong Z. Hormone inhibition during mini-puberty and testicular function in male rats. *Int. J. Endocrinol. Metab*. 2015;13(4):2-6. DOI 10.5812/ijem.25465.
- Cooper T.G., Noonan E., Eckardstein S., Auger G., Baker H.W., Behre H.M., Haugen T.B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M.T., Vogel-song K.M. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update*. 2010;16(3):231-245. DOI 10.1093/humupd/dmp048.
- Daniels J. Catatonia: clinical aspects and neurobiological correlates. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci*. 2009;21(4):371-380. DOI 10.1176/appi.neuropsych.21.4.371.
- Escott G.M., da Rosa L.A., Loss E.S. Mechanisms of hormonal regulation of Sertoli cell development and proliferation: a key process for spermatogenesis. *Curr. Mol. Pharmacol*. 2014;7(2):96-108.
- Hazra R., Corcoran L., Robson M., McTavish K.J., Upton D., Handelsman D.J., Allan C.M. Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol. Endocrinol*. 2013;27(11):12-24. DOI 10.1210/me.2012-1219.
- Kolpakov V.G., Parvez S.H., Barykina N.N. A tentative evolutionary biological approach to the problem of schizophrenia. *Biogenic Amines*. 1986;3(4):299-319.
- Kulikov A.V., Kolpakov V.G., Popova N.K. The genetic cataleptic (GC) rat strain as a model of depressive disorders. In: Kalueff A.V. (Ed.). *Animal Models in Biological Psychiatry*. USA: Nova Sci. Publ., 2006;59-73.
- Markham J.A. Sex steroids and schizophrenia. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2012;13(3):187-207. DOI 10.1007/s11154-011-9184-2.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F. Puberty in the rat. In: Knobil E., Neill J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd., 1994;363-409.
- Ren L., Li X., Weng Q., Trisomboon H., Yamamoto T., Pan L., Watanabe G., Taya K. Effects of acute restraint stress on sperm motility and secretion of pituitary, adrenocortical and gonadal hormones in adult male rats. *J. Vet. Med. Sci*. 2010;72(11):1501-1506.
- Seed J., Chapin R.E., Clegg E.D., Dostal L.A., Foote R.H., Hurtt M.E., Klinefelter G.R., Makris S.L., Perreault S.D., Schrader S., Seyler D., Sprando R., Treinen K.A., Veeramachaneni D.N., Wise L.D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol*. 1996;10(3):237-244.
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003;125(6):769-784.
- Terzian A.C., Andreoli S.B., Razzouk D., Chaves A.C., Mari J.J. Fertility and fecundity of an outpatient sample with schizophrenia. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2006;28(4):305-307.
- Toufexis D., Rivarola M.A., Lara H., Viau V. Stress and the reproductive axis. *J. Neuroendocrinol*. 2014;26(9):573-586. DOI 10.1111/jne.12179.
- Trainor B.C., Sisk C.L., Nelson R.J. Hormones and the development and expression of aggressive behavior. In: Pfaff D.W., Arnold A.P., Etgen A.M., Fahrbach S.E., Rubin R.T. (Eds.). *Hormones, Brain and Behavior*. 2nd ed. San Diego: Acad. Press, 2009;1:167-203. DOI 10.1016/B978-008088783-8.00005-X.
- Wilcox A., Duffy R. The syndrome of catatonia. *Behav. Sci*. 2015;5(4):576-578. DOI 10.3390/bs5040576.
- Worly B.L., Gur T.L. The effect of mental illness and psychotropic medication on gametes and fertility: a systematic review. *J. Clin. Psychiatry*. 2015;76(7):974-985. DOI 10.4088/JCP.14r09080.
- You L., Sar M. Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. *Endocrine*. 1998;9(3):253-261.

Гендер-специфическое влияние мутации A^y у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах

Е.Н. Макарова , Е.И. Денисова, В.В. Кожевникова, А.Е. Кулешова

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

Ожирение матерей в период беременности повышает риск возникновения ожирения у потомства. Для разработки методов коррекции развития потомства у матерей, страдающих метаболическими расстройствами, необходимо изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние материнской среды на онтогенез потомства. Уровень лептина повышается при ожирении. У мышей линии C57Bl мутация A^y вызывает повышение уровня лептина в крови самок во время беременности и оказывает гендер-специфическое влияние на метаболический фенотип потомства в зрелости. Целью работы было изучить влияние мутации A^y на склонность к развитию диетарного ожирения у мужского и женского потомства, на массу плодов и плацент и экспрессию генов в плацентах плодов разного пола. Оценивали массу тела и потребление пищи у мужского и женского потомства A^y/a и a/a (контроль) самок при содержании на стандартной диете и диете, индуцирующей ожирение, массу плодов и плацент на 13-й и 18-й дни беременности и экспрессию генов транспортеров глюкозы (GLUT1, GLUT3), нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2, SNAT4), инсулиноподобного фактора роста 2 IGF2 и его рецептора IGF2R в плацентах плодов мужского и женского пола. Мутация A^y влияла на массу тела только у мужского потомства при содержании на стандартной диете и не оказывала влияния на развитие ожирения у потомства обоего пола. Масса плодов и плацент у A^y/a по сравнению с a/a самками была снижена на 13-й день беременности и не различалась на 18-й день. На 13-й день беременности уровень мРНК исследованных генов в плацентах мужских и женских плодов не различался у a/a самок. У A^y/a самок экспрессия генов, кодирующих GLUT1, GLUT3, SNAT1 и SNAT4, была снижена в плацентах плодов женского пола по сравнению с плацентами плодов мужского пола. Полученные результаты позволяют предполагать, что зависящий от пола плодов транскрипционный ответ плацент на повышенный уровень лептина у беременных A^y/a самок может опосредовать гендер-специфическое влияние мутации A^y на метаболизм потомства в постнатальной жизни.

Ключевые слова: мутация A^y ; лептин; плацента; плод; мыши; экспрессия генов.

Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice

E.N. Makarova , E.I. Denisova, V.V. Kozhevnikova, A.E. Kuleshova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Obesity during pregnancy increases the risk of obesity in offspring. To correct the offspring development in obese mothers, it is necessary to reveal the molecular mechanisms that mediate the influence of the maternal environment on the offspring ontogenesis. Leptin levels increase with obesity. In C57Bl mice, the A^y mutation is associated with elevated blood levels of leptin in pregnant females and exerts a gender-specific effect on the metabolic phenotype of mature offspring. Aim: to study the influence of A^y mutation on sensitivity to diet-induced obesity in male and female offspring, on fetal and placental weight and on the expression of genes in the placentas of the fetuses of different sexes. Body weight and food intake on a standard and an obesogenic diet, fetal and placental weights on pregnancy days 13 and 18, and gene expression of glucose transporters (GLUT1, GLUT3), neutral amino acid transporters (SNAT1, SNAT2, SNAT4), insulin-like growth factor 2 IGF2 and its receptor IGF2R were measured in male and female offspring of a/a (control) and A^y/a mothers. A^y mutation influenced the body weight only in male offspring, which consumed a standard diet, and did not influence obesity development in both male and female offspring. The weight of fetuses and placentas in A^y/a as compared to a/a females was reduced on day 13 of pregnancy and was not different on day 18. On day 13 of pregnancy, the mRNA levels of the examined genes did not differ in placentas of male and female fetuses in a/a females. In A^y/a females, the gene expression of GLUT1, GLUT3, SNAT1 and SNAT4 was reduced in female placentas compared to male placentas. The results suggest that the sex-specific transcription response of placentas to elevated leptin levels in pregnant A^y/a females can mediate the gender-specific impact of A^y mutation on the offspring metabolism in postnatal life.

Key words: A^y mutation; leptin; placenta; fetus; mice; gene expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Макарова Е.Н., Денисова Е.И., Кожевникова В.В., Кулешова А.Е. Гендер-специфическое влияние мутации A^y у мышей на метаболический фенотип потомства, рост плодов и экспрессию генов в плацентах. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):406-414. DOI 10.18699/VJ18.376

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Makarova E.N., Denisova E.I., Kozhevnikova V.V., Kuleshova A.E. Gender-specific influence of A^y mutation on progeny metabolic phenotype, fetal growth and placental gene expression in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):406-414. DOI 10.18699/VJ18.376 (in Russian)

УДК 591.339:575.117.2

Поступила в редакцию 31.03.2018

Принята к публикации 08.05.2018

© АВТОРЫ, 2018

Согласно гипотезе DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), причины, определяющие склонность к развитию хронических заболеваний, лежат в условиях пренатального и раннего постнатального периода жизни особей (Wadhwa et al., 2009; Hoffman et al., 2017). Показано, что недостаточное и избыточное питание, ожирение, диабет в период беременности ассоциированы с повышенным риском возникновения ожирения и связанного с ним диабета 2-го типа у потомства (Vickers, 2014). Это диктует необходимость коррекции развития потомства на ранних этапах жизни у матерей, страдающих метаболическими расстройствами. Для разработки подходов к такой коррекции необходимо изучение молекулярных механизмов, опосредующих влияние материнской среды на метаболический фенотип потомства.

Основную роль в формировании материнской внутриутробной среды играет плацента (Sferruzzi-Perri, Camm, 2016). Она поставляет питательные вещества и факторы роста развивающимся плодам, а транспортная и сигнальная функции плацент определяют скорость роста плодов и массу тела у новорожденных (Grillo et al., 2008; Coan et al., 2010; Sferruzzi-Perri, Camm, 2016). В свою очередь масса новорожденных является маркером их дальнейшего здоровья, поскольку как слишком низкая, так и слишком большая масса при рождении ассоциированы с повышенным риском развития кардиометаболических заболеваний в зрелости (Vickers, 2014). Предполагается, что метаболические нарушения у матерей сопровождаются изменениями в биохимическом составе крови, а также в структуре и функции плацент, что приводит к эпигенетическим модификациям у плода, влияющим на экспрессию генов и дальнейшее развитие (McKau, Mathers, 2011; Vickers, 2014; Bale, 2015; Desai et al., 2015). Однако молекулярные механизмы программирования развития мало исследованы (Bale, 2015) и требуют дальнейшего изучения как у людей, так и на лабораторных моделях.

Как правило, изменения в составе крови, сопровождающие ожирение, включают в себя повышение уровней гормона жировой ткани лептина, инсулина и глюкозы, изменение липидного профиля (Бажан и др., 2005). Вклад каждого из этих факторов в программирующее влияние материнского ожирения на метаболизм потомства мало изучен. На лабораторных моделях показано, что повышенный уровень лептина у матерей во время беременности оказывает влияние на углеводно-жировой обмен у потомства в зрелости, и это влияние может по-разному проявляться у особей разного пола (Pennington et al., 2012; Makarova et al., 2013). Механизмы, посредством которых материнский лептин влияет на развитие плодов, не исследованы. Возможно, он действует на функциональную активность плацент, поскольку в плацентах обнаружена высокая плотность рецепторов к лептину (Hoggard et al., 1997). У мышей мутация *yellow* в локусе агути (A^y) вызывает эктопическую экспрессию белка агути, что приводит к формированию желтой окраски, повышенному потреблению пищи и развитию ожирения с возрастом (Bultman et al., 1992). Ранее мы показали, что самки мышей линии C57Bl с мутацией A^y (генотип A^y/a), которые вступают в размножение на начальных стадиях развития

ожирения, отличаются от самок этой линии (генотип a/a) повышенным потреблением пищи в первую неделю беременности, немного большей массой тела и примерно вдвое более высоким уровнем лептина в крови в период беременности и ничем не отличаются по метаболическим показателям в период лактации (Makarova et al., 2010). Это позволяет рассматривать A^y мышей как модель для изучения программирующего влияния гиперлептинемии матерей, характерной для особей с избыточной массой жира (Frederich et al., 1995), на метаболические признаки у потомства при отсутствии у беременных самок выраженного ожирения. В этой модели мы обнаружили, что при содержании на стандартной диете мужское потомство A^y/a самок отличается по некоторым метаболическим признакам (массе тела, чувствительности к лептину) от мужского потомства a/a самок, тогда как на женское потомство генотип матери не оказывает влияния (Makarova et al., 2013). Полученные данные позволяют предполагать, что гиперлептинемия у беременных самок может по-разному влиять на развитие мужского и женского потомства, и использовать эту модель для изучения механизмов гендер-специфического программирования развития в пренатальный период жизни.

Гендер-специфическое влияние материнской среды может быть опосредовано тем, что плаценты плодов разного пола по-разному реагируют на изменения в составе материнской крови (Gallou-Kabani et al., 2010; Mao et al., 2010; Gabory et al., 2012). Возможно, повышенный во время беременности уровень лептина у A^y самок влияет на функциональную активность плацент, и это влияние зависит от пола плодов.

Целью данной работы было изучение влияния мутации A^y , вызывающей повышение уровня лептина в период беременности, на склонность к развитию диетарного ожирения у потомства разного пола, а также на массу плодов и плацент и экспрессию генов транспортеров глюкозы (GLUT1, GLUT3), нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2 и SNAT4) и ростовых факторов (инсулиноподобный фактор роста 2 IGF2 и его рецептор IGF2R) в плацентах плодов мужского и женского пола.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились в соответствии с международными Европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС) и Российскими этическими стандартами по содержанию и обращению с лабораторными животными.

В экспериментах использовали мышей линии C57Bl/6J стандартного агути генотипа (a/a) и мышей этой линии, несущих мутацию *yellow* в локусе агути (A^y/a генотип), из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Мышей содержали при световом режиме 12 ч свет : 12 ч темнота и свободном доступе к воде и гранулированному корму для конвенционального содержания и разведения (ЗАО «Ассортимент-Агро», Сергиев Посад, Россия).

В возрасте 8–9 недель самок спаривали с самцами в реципрокных скрещиваниях $a/a \times A^y/a$ и $A^y/a \times a/a$, дающих a/a и A^y/a потомство в отношении 1:1. Покрытие регистрировали по вагинальной пробке, день обнаружения пробки

считали нулевым днем беременности. После покрытия самок переводили на индивидуальное содержание.

Для измерения массы плацент и плодов *a/a* и *A^y/a* самок умерщвляли смещением шейных позвонков на 13-й либо на 18-й день беременности, извлекали матку с плодами, помещали ее на охлажденную платформу, высвобождали плоды и плаценты и взвешивали плаценты и плоды на 13-й день беременности на торсионных весах (размерность шкалы до 0.5 мг), а плоды на 18-й день беременности на электрических весах (размерность шкалы до 10 мг). Пол плодов на 18-й день беременности определяли визуально по наличию семенников или матки, на 13-й день беременности у плодов забирали образцы ткани печени и помещали их в жидкий азот для дальнейшего определения пола методом ПЦР. На 13-й день беременности забирали образцы тканей плацент для определения экспрессии генов и помещали их в жидкий азот. Массу плодов и плацент подсчитывали для самок с количеством плодов шесть или семь (12 *a/a* и 13 *A^y/a* самок на 13-й день беременности и 13 *a/a* и 18 *A^y/a* самок на 18-й день беременности).

Для оценки влияния агути-генотипа самок на метаболический фенотип потомства регистрировали дату родов и размер помета. День родов считали первым днем постнатальной жизни, у самок с пометом из шести или семи детенышей (всего 12 самок *a/a* и 15 самок *A^y/a* генотипов) взвешивали мышат в день 1, 7, 14, 21, 28 постнатальной жизни, генотип детенышей определяли на 7-й день, пол – на 14-й. На 28-й день после рождения детенышей отсаживали, по одной самке и одному самцу *a/a* генотипа из каждого помета содержали индивидуально в течение 12 недель (с 4 по 16 неделю постнатальной жизни) на стандартном корме, еженедельно измеряли массу тела и количество потребленного корма. Начиная с 16-й недели половину животных содержали на стандартной диете, другую половину переводили на сладко-жирную диету, для чего к стандартному корму добавляли семя подсолнечника в кожуре, сдобное сладкое печенье и свиное сало, продолжая еженедельно измерять массу и количество потребленного стандартного корма. Через 8 недель содержания на диете (с 16 по 24 неделю жизни) животных подвергали декапитации, собирали образцы крови в пробирки с ЭДТА, оценивали количество внутрибрюшинного жира. В образцах плазмы крови измеряли концентрации лептина и глюкозы.

Концентрацию лептина в плазме крови измеряли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора (R&D Systems, Миннеаполис, США), концентрацию глюкозы – коммерческим набором Fluitest GLU (Analyticon Biotechnologies AG, Лихтенфельс, Германия), следуя инструкциям производителя.

Определение пола плодов на 13-й день беременности. Пол плодов определяли с помощью ПЦР с геномной ДНК с детекцией продукта в агарозном геле с использованием праймеров SX_F, 5'-GATGATTTGAGTGGAAATGTGAG GTA-3'; SX_R, 5'-CTTATGTTTATAGGCATGCACCATG TA-3' (McFarlane et al., 2013). В ходе реакции амплифицировались фрагменты псевдоаутосомных генов *Sly* (сцеплен с Y-хромосомой, дает один фрагмент размером 280 п. н.) и *Xlr* (сцеплен с X-хромосомой, дает два фрагмента длиной 685 и 480 п. н.) (рис. 1). ДНК выделяли из печени

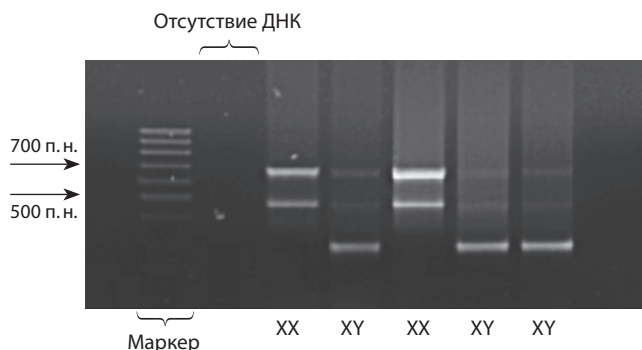


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов генов *Sly* и *Xlr*.

плодов солевым методом по протоколу, предложенному в (Aljanabi, Martinez, 1997).

Для оценки экспрессии генов в плацентах выбрали по шесть самок каждого генотипа с примерно равным представительством плодов мужского и женского пола. Для каждой из отобранных самок формировали две пробы РНК, объединенные по полу плодов, для чего объединяли по отдельности РНК из плацент плодов мужского и женского пола так, чтобы представительство РНК из каждого образца было одинаковым.

Уровень мРНК генов в плацентах определяли методом относительной оценки с помощью обратной транскрипции и полимеразно-цепной реакции в реальном времени (Relative quantitation real-time PCR). Из образцов плацент выделяли РНК с использованием реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA («Евроген», Москва, Россия), согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV обратной транскриптазы («Евроген») и олиго-dT праймера по протоколу производителя.

ПЦР проводили на приборе Applied Biosystems®, ViiA™ 7 согласно инструкции с помощью готовой реакционной смеси qPCRmix-HS LowROX («Евроген») и реагентов фирмы Applied Biosystems: TaqMan Gene Expression Assay для генов мыши (*Igf2*, Mm00439564_m1; *Igf2R*, Mm00439576_m1; *Slc2a1* (*Glut1*), Mm00441480_m1; *Slc2a3* (*Glut3*), Mm00441483_m1; *Slc38a1* (*SNAT1*), Mm00506391_m1; *Slc38a2* (*SNAT2*), Mm00628416_m1; *Slc38a4* (*SNAT4*), Mm00459056_m1; *ObRb-LepR*, Mm00440181_m1) с использованием β-актина в качестве эндогенного контроля (TaqMan endogenous controls with FAM dye label and MGB mouse β-actin (ACTB)). Относительную экспрессию подсчитывали по пороговому циклу амплификации (относительный CT-метод).

Статистическая обработка. Для оценки влияния генотипа самок мышей на потребление пищи и изменения массы тела у потомства с возрастом использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с грациями факторов: «генотип матери» (*a/a*, *A^y/a*), «пол» потомства, «возраст» (5–16 недель), с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью post-hoc критерия Дункана. Далее использовали двухфакторный дисперсионный анализ отдельно для самцов и самок мышей с грациями факторов «генотип матери» и «возраст». Влияние генотипа самок

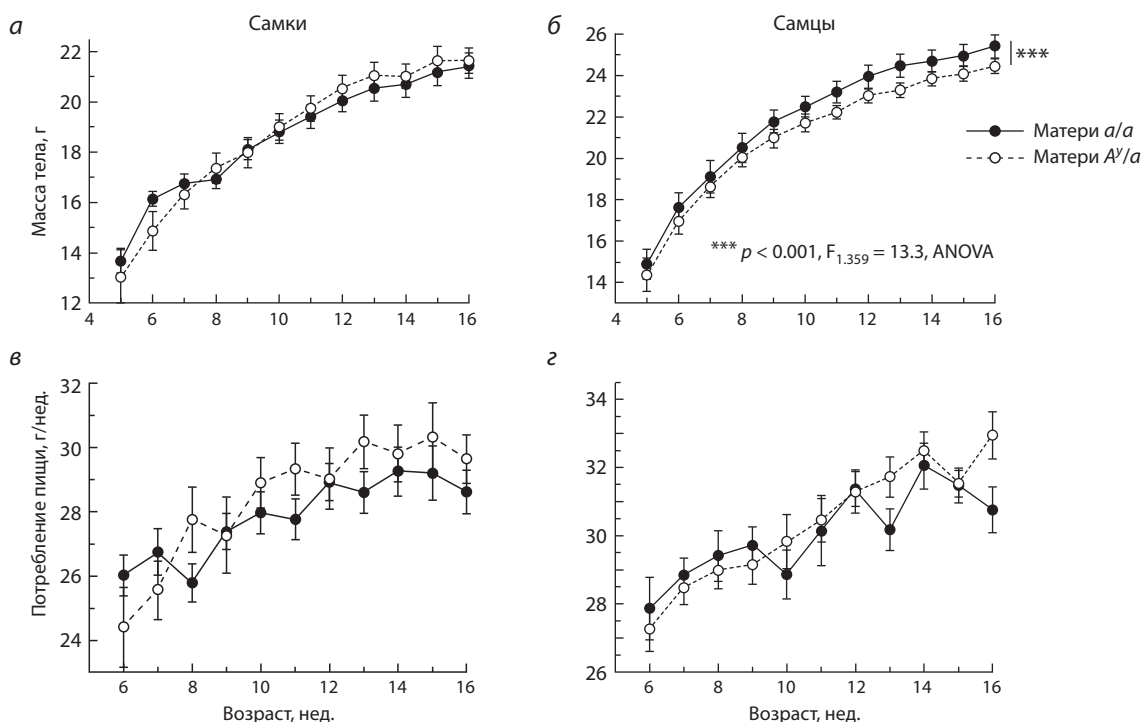


Рис. 2. Влияние агути генотипа самок мышей на массу тела и потребление пищи у мужского и женского потомства после отъема от матерей.

Здесь и далее данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибка среднего.

мышей на развитие ожирения у потомства оценивали с помощью дисперсионного анализа с градациями факторов «генотип матери», «пол», «диета» для параметров крови и доли жира; «генотип матери», «время содержания на диете» (16–24 недели) и «диета» по отдельности у мужского и женского потомства для массы тела. Массу плодов и плацент и экспрессию генов в плацентах анализировали с помощью ANOVA с градациями факторов «генотип матери» и «пол». Для выявления межгрупповых различий по необходимости использовали t -критерий Стьюдента. Результаты на графиках представлены в виде значений среднего $\pm$ ошибка среднего.

Результаты

Влияние агути генотипа самок на рост детенышей в период материнской опеки, массу тела и потребление пищи после отъема от матерей с 4 по 16 неделю жизни и развитие диет-индуцированного ожирения

Генотип самок не оказывал влияния на рост потомства в период материнской опеки. Детеныши, рожденные самками a/a и A^y/a генотипов, не различались по массе тела с 1-го по 28-й день жизни.

Генотип самок не оказывал влияния на потребление пищи ни у мужского, ни у женского потомства (рис. 2, в, г), но оказывал отсроченное, зависящее от пола влияние на массу тела после отъема от матерей. У женского потомства, полученного от a/a и A^y/a самок, масса тела не различалась (см. рис. 2, а). У мужского потомства генотип матери оказывал достоверное влияние на массу тела с 5 по 16 недели жизни ($p < 0.001, F_{1,359} = 13.3, 2\text{-way ANOVA}$)

(см. рис. 2, б): потомство A^y/a матерей обладало меньшей массой тела, чем потомство a/a матерей. Отношение потребления пищи к массе тела было повышенным у мужского потомства A^y/a матерей по сравнению с мужским потомством a/a матерей ($p < 0.01, F_{1,305} = 9.97, 2\text{-way ANOVA}$).

Сладко-жирная пища вызывала развитие ожирения как у самцов ($p < 0.000^*, F_{1,234} = 55.85$), так и у самок ($p < 0.000^*, F_{1,445} = 53.5, 3\text{-way ANOVA}$) (рис. 3). Кроме того, у самцов выявлено достоверное взаимодействие факторов материнского генотипа и диеты ($p < 0.05, F_{1,234} = 4.25$), что свидетельствует о различном влиянии материнского генотипа на массу тела самцов при содержании на разных диетах: генотип матери оказывал достоверное влияние на массу тела только при содержании на стандартной диете ($p < 0.05, F_{1,116} = 4.7$) (см. рис. 3) и не оказывал влияния при содержании на сладко-жирной пище. У женского потомства генотип матери не оказывал достоверного влияния на массу тела ни на стандартной диете, ни на сладко-жирной пище.

Содержание внутрибрюшинного жира, концентрации лептина и глюкозы в крови возрастали при ожирении ($p < 0.01$ для всех, $F_{1,52} = 16.7, F_{1,42} = 7.7, F_{1,43} = 22.8$ для жира, лептина и глюкозы соответственно). Эти показатели не зависели от генотипа матери и пола (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у мышей мутация A^y , вызывающая хроническую гиперлептемию при беременности, оказывает зависящее от пола программирующее влияние на метаболический фенотип потомства и не предрасполагает потомство к развитию алиментарного ожирения.

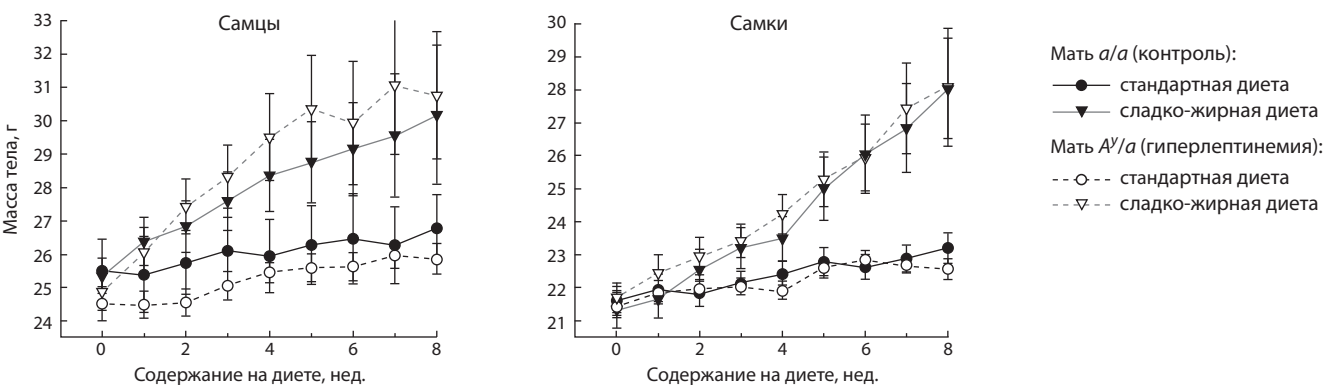


Рис. 3. Влияние агути генотипа самок мышей на развитие алиментарного ожирения у мужского и женского потомства в зрелости.

Таблица 1. Влияние сладко-жирной пищи на количество внутрибрюшинного жира и концентрации лептина и глюкозы в плазме крови у мужского и женского потомства *a/a* и *A^y/a* самок мышей

Показатель	Женское потомство				Мужское потомство			
	Стандартная диета		Сладко-жирная диета		Стандартная диета		Сладко-жирная диета	
	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>	<i>a/a</i>	<i>A^y/a</i>
Жир, г	0.3±0.0 (7)	0.3±0.1 (5)	1.1±0.2 (8)	1.8±0.8 (6)	0.4±0.1 (7)	0.3±0.1 (5)	1.2±0.5 (6)	1.1±0.4 (8)
Жир, %	1.4±0.1 (7)	1.5±0.3 (5)	4.2±0.8 (8)	5.3±2.0 (6)	1.6±0.4 (7)	1.3±0.2 (5)	3.7±1.2 (6)	3.5±0.6 (8)
Лептин, нг/мл	2.9±0.7 (6)	1.8±0.3 (5)	7.4±2.3 (8)	15.2±6.3 (6)	2.9±0.9 (6)	2.0±0.7 (5)	4.6±1.8 (5)	5.8±0.7 (7)
Глюкоза, мМ	8.9±0.2 (7)	8.5±0.9 (5)	11.8±0.7 (8)	10.5±0.8 (6)	8.5±0.7 (6)	9.9±0.8 (5)	12.0±1.7 (5)	12.8±0.9 (7)

Примечание. Результаты представлены в виде среднего ± ошибка среднего, в скобках указано число случаев.

Таблица 2. Влияние мутации *A^y* на массу самок мышей, их плодов и плацент на 13-й и 18-й дни беременности

Масса	<i>a/a</i>		<i>A^y/a</i>	
	13-й день беременности	18-й день беременности	13-й день беременности	18-й день беременности
Тела, г	27.0±0.65 (11)	31.1±1.1 (13)	26.7±0.53 (13)	32.8±1.0 (18)
Мужских плодов, мг	140.4±4.7 (22)	1081±20 (37)	127.0±2.4 (31)*	1100±20 (54)
Женских плодов, мг	132.6±2.9 (36)	1067±16 (46)	124.7±2.8 (41)	1097±16 (60)
Плацент мужских плодов, мг	96.7±3.9 (24)^	116.6±6.4 (37)	87.0±4.2 (31)^*	120.0±4.3 (54)^
Плацент женских плодов, мг	84.7±2.5 (37)	104.0±3.7 (46)	80.8±2.8 (41)*	104.2±3.0 (60)

* $p < 0.05$ (post-hoc Duncan test), *A^y/a* по сравнению с *a/a*; ^ $p < 0.05$ (post-hoc Duncan test), самцы по сравнению с самками. Результаты представлены в виде среднего ± ошибка среднего, в скобках указано число случаев.

Влияние мутации *A^y* на массу плодов и плацент

Самки *a/a* и *A^y/a* генотипов не различались по массе тела ни на 13-й, ни на 18-й день беременности. Они не отличались также друг от друга по массе плодов и плацент на 18-й день беременности. На 13-й день беременности масса плодов обоих полов и их плацент у *A^y/a* самок была ниже, чем у контрольных самок ($p = 0.001$, $F_{1,126} = 11.2$ для плодов; $p < 0.05$, $F_{1,129} = 4.2$ для плацент) (табл. 2). У *A^y/a* по сравнению с *a/a* самками масса мужских плодов была снижена на 9.6 %, масса их плацент – на 10 %, масса женских плодов – на 6 %, масса их плацент – на 4.6 %. Плоды мужского и женского пола не различались по массе, тогда как плаценты плодов мужского пола весили больше плацент плодов женского пола и на 13-й, и на 18-й день бе-

ременности ($p < 0.01$, $F_{1,129} = 7.4$ на 13-й день; $F_{1,193} = 10.8$ на 18-й день беременности) (см. табл. 2).

Экспрессия генов в плацентах

Поскольку генотип самки оказывал выраженное влияние на массу плодов только на 13-й день беременности, мы решили оценить экспрессию генов в плацентах именно на этом сроке. Рост плодов зависит от интенсивности транспорта питательных веществ через плаценту и от сигнальных факторов, секретируемых плацентами в кровь плодов. Поэтому в плацентах мы оценивали уровни мРНК генов, кодирующих переносчики глюкозы (GLUT1, GLUT3), переносчики нейтральных аминокислот (SNAT1, SNAT2, SNAT4), а также уровни мРНК генов, кодирующих IGF2,

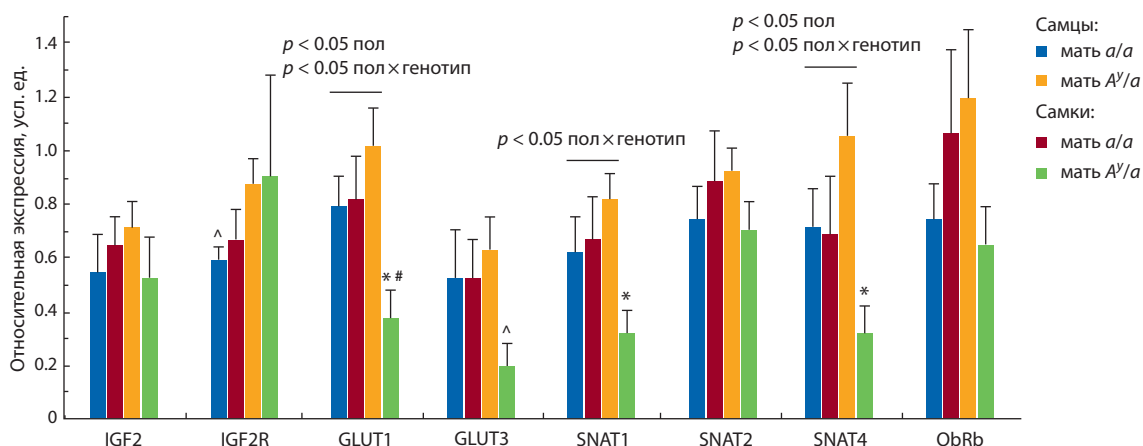


Рис. 4. Влияние мутации A^y у мышей на экспрессию генов транспортных и сигнальных белков в плацентах плодов мужского и женского пола на 13-й день беременности.

* $p < 0.05$ между плацентами плодов мужского и женского пола у A^y/a самок мышей (post-hoc Duncan test); # $p < 0.05$ между плацентами плодов женского пола у A^y/a и a/a самок мышей (post-hoc Duncan test); ^ $p < 0.05$ (критерий Стьюдента) между плацентами плодов мужского и женского пола у A^y/a самок мышей для GLUT3 и между плацентами плодов мужского пола у a/a и A^y/a самок для IGF2R.

который усиливает процессы роста в плаценте и у плода, и IGF2R – рецептора к IGF2, при связывании с которым комплекс лиганд-рецептор интернализуется и разрушается внутри клетки, вследствие чего снижается активность IGF2. Результаты представлены на рис. 4.

Дисперсионный анализ выявил достоверное взаимодействие факторов материнского генотипа и пола плодов на экспрессию генов, кодирующих GLUT1, SNAT1 и SNAT4 ($p < 0.05$ для всех, $F_{1,20} = 6.56$ для GLUT1, $F_{1,20} = 4.9$ для SNAT1, $F_{1,20} = 4.36$ для SNAT4). Если у контрольных самок уровень мРНК этих генов не различался в плацентах плодов мужского и женского пола, то у A^y/a самок экспрессия этих генов была достоверно ниже в плацентах плодов женского пола по сравнению с плацентами плодов мужского пола. Кроме того, сравнение межгрупповых средних по критерию Стьюдента показало, что у A^y/a самок экспрессия GLUT3 в плацентах плодов женского пола была ниже, чем в плацентах плодов мужского пола, а экспрессия гена рецептора к IGF2 в плацентах плодов мужского пола была выше у A^y/a самок по сравнению с a/a самками. Полученные результаты показывают, что мутация A^y оказывает влияние на экспрессию плацентарных генов, регулирующих рост плодов, и это влияние зависит от пола плодов.

Обсуждение

Данное исследование было предпринято для того, чтобы оценить влияние мутации A^y у мышей на склонность к развитию ожирения у потомства разного пола и для проверки предположения, что гендер-специфическое влияние мутации на метаболический фенотип потомства может быть связано с различающейся в зависимости от пола плодов реакцией плацент на изменения материнской среды, вызванные этой мутацией.

Результаты подтвердили полученные ранее данные о том, что мутация оказывает гендер-специфическое отсроченное влияние на метаболизм потомства: снижает массу тела только у мужского потомства при содержании в

стандартных условиях (Makarova et al., 2013). Поскольку в период беременности A^y/a самки отличаются от a/a самок повышенным уровнем лептина и не различаются по другим биохимическим показателям крови (кортикостерон, глюкоза, инсулин) (Makarova et al., 2010), мы предполагаем, что отсроченные материнские воздействия связаны с влиянием именно лептина на развивающееся потомство. Ранее нами установлено, что однократное введение лептина в конце беременности снижает массу тела у потомства на стандартной диете (Makarova et al., 2013). В исследованиях других авторов тоже обнаружено, и в генетической модели, и при введении лептина, что гиперлептинемия при беременности сопровождается меньшей массой у потомства, причем у крыс масса была снижена только у женского потомства (Nilsson et al., 2003), а у мышей – вне зависимости от пола (Pollock et al., 2015). Меньшая масса тела у мужского потомства A^y/a самок по сравнению с потомством a/a самок наблюдалась при одинаковом потреблении пищи, что предполагает более интенсивный расход энергии у этих животных. В работе на мышах показано (Pollock et al., 2015), что гиперлептинемия беременности ассоциирована с повышенной двигательной активностью у потомства. Возможно, у мужского потомства A^y/a самок тоже повышена двигательная активность, этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Гиперлептинемия у самок с мутацией A^y не повлияла на исследованные нами метаболические характеристики у потомства при развитии ожирения на сладко-жирной диете. Эти результаты отличаются от данных, полученных другими авторами в экспериментах на мышах и крысах. У крыс введение лептина в конце беременности и в период лактации подавляло развитие ожирения, индуцированного диетой, у потомства обоих полов (Stocker et al., 2007). У мышей повышенный уровень лептина у беременных $db/+$ самок мышей и введение лептина в течение всей беременности и первых дней после родов снижали массу тела у потомства на диете, индуцирующей ожирение (Pollock et al., 2015), не изменяя при этом

процентного содержания жира (Talton et al., 2016), что говорит о влиянии материнского лептина на линейный рост потомства, а не на развитие ожирения как такового. Несовпадение результатов по реакции потомства на диету, индуцирующую ожирение, в нашей модели и в моделях, использованных другими авторами (Pollock et al., 2015), может быть обусловлено особенностями проведения экспериментов, такими как состав диеты или концентрации лептина в крови самок на разных сроках беременности и лактации. В целом результаты подтверждают положение о том, что повышенный уровень лептина в крови у беременных самок не предрасполагает потомство к развитию ожирения, индуцированного диетой, и указывают на то, что материнский лептин может по-разному воздействовать на развитие мужского и женского потомства.

Механизмы программирующего действия лептина практически не изучены. Поскольку скорость роста плодов отражает множественные влияния материнской среды, мы оценили массу плодов у *a/a* и *A^y/a* самок на разных стадиях беременности. Оказалось, что мутация меняет динамику роста плодов: замедляет скорость роста плодов в первые две трети беременности (на 13-й день масса плодов была снижена), а затем, по-видимому, плоды демонстрируют догоняющий рост (в конце беременности масса плодов уже не различалась). По немногочисленным литературным данным, материнский лептин может снижать массу плодов: введение лептина во второй половине беременности снижало массу плодов у мышей (Yamashita et al., 2001) и массу новорожденных крысят (Stocker et al., 2007).

Пропорциональное снижение массы плацент и плодов указывает на то, что уменьшение физических размеров плацента может быть основной причиной замедления роста плодов. К 13-му дню беременности у мышей зона лабиринта, где осуществляется транспорт питательных веществ из крови матери в кровь плода, составляет уже значительную часть плаценты (примерно треть) (Coan et al., 2004), и уменьшение этой зоны может существенным образом сказаться на поставке нутриентов развивающимся плодам. Механизмы влияния лептина на физическое состояние плацент требуют дальнейшего изучения. Возможно, лептин подавляет ангиогенез в плацентах, поскольку в экспериментах *in vitro* было показано, что лептин снижает секрецию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) клетками цитотрофобласта (Islami et al., 2003).

Ответ со стороны плодов на изменение уровня лептина в материнской крови может зависеть от чувствительности плацент к действию лептина. В работе (Yamashita et al., 2001) показано, что введение лептина снижает массу плодов и плацент только у мышей дикого типа и не влияет на гетерозигот по мутации *db*, несущих одну дозу гена рецептора к лептину. На 13-й день беременности масса плацент у *A^y/a* самок была снижена, а на 18-й день – не различалась, хотя повышенный уровень лептина у *A^y/a* самок наблюдается на обоих сроках беременности. Можно предположить, что с ростом уровня лептина в крови у *A^y/a* самок развивается резистентность к его действию в плацентах. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

Кроме влияния на физические размеры плацент, повышение уровня лептина у *A^y/a* самок сопровождалось

изменением экспрессии генов транспортеров питательных веществ и сигнальных факторов в плацентах. Введение лептина в первой половине беременности самкам мышей, ограниченным в потреблении белков, вызывало изменения транскриптома в плацентах (Schulz et al., 2012), что указывает на возможность непосредственного влияния материнского лептина на транскрипционные процессы в плацентах. Гендер-специфическое воздействие мутации *A^y* на метаболические признаки у потомства может быть связано с разным транскрипционным ответом плацент у плодов мужского и женского пола на изменения уровня лептина в материнской крови.

Нами обнаружены яркие проявления полового диморфизма по массе плацент у самок обоих генотипов и по экспрессии генов в плацентах у *A^y/a* самок. Мутация *A^y* дифференцирует плаценты плодов разного пола по экспрессии некоторых генов, в основном за счет снижения экспрессии в плацентах плодов женского пола. Снижение экспрессии генов, кодирующих переносчики глюкозы и аминокислот, может быть одной из причин уменьшения массы плодов женского пола. Однако масса плодов мужского пола также была снижена. При этом в плацентах плодов мужского пола у *A^y/a* самок была повышена экспрессия гена, кодирующего IGF2R. Этот рецептор связывается с IGF2 и транспортирует его в лизосомы, таким образом снижая уровень IGF2 во внеклеточном пространстве (Wutz et al., 2001). Повышение экспрессии IGF2R может приводить к снижению уровня IGF2 в плацентах мужских плодов, что может быть причиной снижения массы мужских плодов, поскольку IGF2 стимулирует рост плодов (DeChiara et al., 1990). Кроме того, отсутствие различий в массе плодов разного пола, возможно, связано с развитием компенсаторных механизмов. Наличие таких механизмов продемонстрировано в работах, в которых исследовалось изменение экспрессии IGF2 и транспортеров глюкозы и аминокислот в плацентах. Показано, что в ответ на снижение уровня экспрессии гена IGF2 в плацентах происходит компенсаторное усиление вторичного транспорта аминокислот, опосредованного белками-переносчиками системы А (Constância et al., 2005), и наоборот – в ответ на усиление экспрессии IGF2 происходит снижение экспрессии транспортера глюкозы GLUT3 и транспортера нейтральных аминокислот SNAT4 (Angiolini et al., 2011).

Гендер-специфический ответ со стороны плацент на материнские воздействия является хорошо установленным феноменом. У мышей плаценты плодов разного пола по-разному отвечали на материнское ожирение (Kim et al., 2014), диету матерей (Gallou-Kabani et al., 2010; Mao et al., 2010; Gabory et al., 2012), гипоксию (Cuffe et al., 2014), изменение гормонального фона (Cuffe et al., 2011, 2012). Однако вопрос о молекулярных механизмах, лежащих в основе этого явления, до настоящего времени не исследован и ждет своего разрешения.

Несмотря на то что масса плацент и плодов у *A^y/a* самок была снижена независимо от пола плодов и экспрессия генов была изменена также в плацентах плодов обоего пола, отсроченные влияния генотипа матери на метаболические признаки были обнаружены только у мужского потомства. Скорее всего, это связано с выбором изученных признаков. Для самок наиболее значимым признаком с эволюционной

точки зрения является плодовитость. Возможно, агути генотип самок влияет на параметры плодовитости у женского потомства, но этот вопрос до сих пор не изучался.

Заключение

У мышей мутация *A^y*, вызывающая гиперлептинемия в период беременности, оказывает зависящее от пола влияние на метаболический фенотип потомства в зрелости, влияет на массу плацент и динамику роста плодов, а также вызывает различия по экспрессии генов сигнальных и транспортных белков в плацентах плодов мужского и женского пола в середине беременности. Можно предположить, что гендер-специфическое влияние *A^y/a* генотипа самок мышей на метаболические признаки у потомства связано с тем, что развивающаяся у таких самок гиперлептинемия по-разному влияет на экспрессию генов сигнальных и транспортных белков в плацентах плодов разного пола.

Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (14-04-00694-а и 17-04-01357-а) и бюджетным проектом 0324-2018-0016. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Список литературы / References

- Бажан Н.М., Яковлева Т.В., Багинская Н.В., Шевченко А.Ю., Макарова Е.Н. Изменения углеводно-жирового обмена в ходе развития меланокортинового ожирения у мышей с мутацией Agouti yellow. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2005; 91(12):1445-1453. [Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Baginskaia N.V., Shevchenko A.Yu., Makarova E.N. Changes of lipid-carbohydrate metabolism during development of melanocortin obesity in the mice with the Agouti yellow mutation. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2005;91(12):1445-1453. (in Russian)]
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:4692-4693.
- Angiolini E., Coan P.M., Sandovici I., Iwajomo O.H., Peck G., Burton G.J., Sibley C.P., Reik W., Fowden A.L., Constância M. Developmental adaptations to increased fetal nutrient demand in mouse genetic models of Igf2-mediated overgrowth. *FASEB J.* 2011;25:1737-1745.
- Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16(6):332-344. DOI 10.1038/nrn3818.
- Bultman S.J., Michaud E.J., Woychik R.P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 1992;71:1195-1204.
- Coan P.M., Ferguson-Smith A.C., Burton G.J. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol. Reprod.* 2004;70(6):1806-1813.
- Coan P.M., Vaughan O.R., Sekita Y., Finn S.L., Burton G.J., Constância M., Fowden A.L. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J. Physiol.* 2010; 588:527-538.
- Constância M., Angiolini E., Sandovici I., Smith P., Smith R., Kelsey G., Dean W., Ferguson-Smith A., Sibley C.P., Reik W., Fowden A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(52):19219-19224.
- Cuffe J.S., Dickinson H., Simmons D.G., Moritz K.M. Sex specific changes in placental growth and MAPK following short term maternal dexamethasone exposure in the mouse. *Placenta.* 2011;32(12): 981-989. DOI 10.1016/j.placenta.2011.09.009.
- Cuffe J.S., O'Sullivan L., Simmons D.G., Anderson S.T., Moritz K.M. Maternal corticosterone exposure in the mouse has sex-specific effects on placental growth and mRNA expression. *Endocrinology.* 2012;153(11):5500-5511. DOI 10.1210/en.2012-1479.
- Cuffe J.S., Walton S.L., Singh R.R., Spiers J.G., Bielefeldt-Ohmann H., Wilkinson L., Little M.H., Moritz K.M. Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. *J. Physiol.* 2014;592(14):3127-3141. DOI 10.1113/jphysiol.2014.272856.
- DeChiara T.M., Efstratiadis A., Robertson E.J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990;45:78-80.
- Desai M., Jellyman J.K., Ross M.G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int. J. Obes. (Lond).* 2015; 39(4):633-641. DOI 10.1038/ijo.2015.13.
- Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Löllmann B., Lowell B.B., Flier J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* 1995;1:1311-1314.
- Gabory A., Ferry L., Fajardy I., Jouneau L., Gothié J.D., Vigé A., Fleur C., Mayeur S., Gallou-Kabani C., Gross M.S., Attig L., Vambergue A., Lesage J., Reusens B., Vieau D., Remacle C., Jais J.P., Junien C. Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS One.* 2012;7(11):e47986. DOI 10.1371/journal.pone.0047986.
- Gallou-Kabani C., Gabory A., Tost J., Karimi M., Mayeur S., Lesage J., Boudadi E., Gross M.S., Taurelle J., Vigé A., Breton C., Reusens B., Remacle C., Vieau D., Ekström T.J., Jais J.P., Junien C. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14398. DOI 10.1371/journal.pone.0014398.
- Grillo M.A., Lanza A., Colombatto S. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids.* 2008;34:517-523.
- Hoffman D.J., Reynolds R.M., Hardy D.B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr. Rev.* 2017;75(12):951-970. DOI 10.1093/nutrit/nux053.
- Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., Mercer J.G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94(20):11073-11078.
- Islami D., Bischof P., Chardonnes D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol. Hum. Reprod.* 2003;9(7):395-398. DOI 10.1093/molehr/gag053.
- Kim D.W., Young S.L., Grattan D.R., Jasoni C.L. Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol. Reprod.* 2014;90:130. DOI 10.1095/biolreprod.113.117259.
- Makarova E.N., Chepeleva E.V., Panchenko P.E., Bazhan N.M. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;305:R1268-R1280.
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Shevchenko A.Y., Bazhan N.M. Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in *A^y/a* mice. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2010;198(2):169-177. DOI 10.1111/j.1748-1716.2009.02046.x.
- Mao J., Zhang X., Sieli P.T., Falduto M.T., Torres K.E., Rosenfeld C.S. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(12):5557-5562.
- McFarlane L., Truong V., Palmer J.S., Wilhelm D. Novel PCR assay for determining the genetic sex of mice. *Sex. Dev.* 2013;7:207-211. DOI 10.1159/000348677.

- McKay J.A., Mathers J.C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta. Physiol. (Oxf)*. 2011;202(2):103-118. DOI 10.1111/j.1748-1716.2011.02278.x.
- Nilsson C., Swolin-Eide D., Ohlsson C., Eriksson E., Ho H.P., Björntorp P., Holmäng A. Reductions in adipose tissue and skeletal growth in rat adult offspring after prenatal leptin exposure. *J. Endocrinol.* 2003;176:13-21.
- Pennington K.A., Harper J.L., Sigafoos A.N., Beffa L.M., Carleton S.M., Phillips C.L., Schulz L.C. Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice. *Endocrinology*. 2012;153:4556-4567.
- Pollock K.E., Stevens D., Pennington K.A., Thaisrivongs R., Kaiser J., Ellersieck M.R., Miller D.K., Schulz L.C. Hyperleptinemia during pregnancy decreases adult weight of offspring and is associated with increased offspring locomotor activity in mice. *Endocrinology*. 2015;156:3777-3790.
- Schulz L.C., Schlitt J.M., Caesar G., Pennington K.A. Leptin and the placental response to maternal food restriction during early pregnancy in mice. *Biol. Reprod.* 2012;87(5):120. DOI 10.1095/biolreprod.112.103218.
- Sferruzzi-Perri A.N., Camm E.J. The programming power of the placenta. *Front. Physiol.* 2016;7:33. DOI 10.3389/fphys.2016.00033.
- Stocker C.J., Wargent E., O'Dowd J., Cornick C., Speakman J.R., Arch J.R., Cawthorne M.A. Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292:R1810-R1818.
- Talton O.O., Pennington K.A., Pollock K.E., Bates K., Ma L., Ellersieck M.R., Schulz L.C. Maternal hyperleptinemia improves offspring insulin sensitivity in mice. *Endocrinology*. 2016;157:2636-2648.
- Vickers M.H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients*. 2014;6(6):2165-2178. DOI 10.3390/nu6062165.
- Wadhwa P.D., Buss C., Entringer S., Swanson J.M. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 2009;27(5):358-368. DOI 10.1055/s-0029-1237424.
- Wutz A., Theussl H.C., Dausman J., Jaenisch R., Barlow D.P., Wagner E.F. Non-imprinted *Igf2r* expression decreases growth and rescues the *Tme* mutation in mice. *Development*. 2001;128(10):1881-1887.
- Yamashita H., Shao J., Ishizuka T., Klepcyk P.J., Muhlenkamp P., Qiao L., Hoggard N., Friedman J.E. Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous *Lepr^{db/+}* mice: effects on placental leptin and fetal growth. *Endocrinology*. 2001;142:2888-2897.



Взаимосвязь прионов с некодирующими РНК

Р.Н. Мустафин¹✉, Э.К. Хуснутдинова^{1, 2}

¹ Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

Прионы – это альтернативные инфекционные конформации ряда клеточных белков. В отношении протеина PrP^C (PrP – от англ. prion protein, C – common, обычный) прионная конформация, получившая название PrP^{Sc} (Sc – scrapie, скреппи, или почечу овец), оказалась патологической. У млекопитающих PrP^{Sc} является этиологическим фактором трансмиссивных губчатых энцефалопатий, характеризующихся накоплением в головном мозге агрегатов PrP^{Sc}, которые обладают амилоидными свойствами. МикроРНК и длинные некодирующие РНК могут транслироваться в функциональные пептиды, оказывающие регуляторное воздействие на гены, продуктами которых они служат. Сделано предположение о роли активации специфических некодирующих РНК под влиянием прионов в качестве одного из механизмов патогенеза прионных болезней. Обнаружены изменения уровней микроРНК в тканях головного мозга, а также в экзосомах, содержащих аномальную изоформу PrP^{Sc} у больных трансмиссивными губчатыми энцефалопатиями. Выявлены ассоциации аллелей микроРНК с развитием болезни, что говорит о возможной роли специфических последовательностей некодирующих РНК в катализе образования прионов из нормального белка. Предполагается, что измененные N-концевые пространственные домены PrP^{Sc} способны связываться с регуляторными последовательностями специфических генов некодирующих РНК. В результате активируется экспрессия данных некодирующих РНК, которые, в свою очередь, могут взаимодействовать с PrP^C, катализируя их преобразование в PrP^{Sc}. Происходит экспоненциальный рост количества PrP^{Sc}. В головном мозге животных и человека наблюдается активность мобильных элементов, оказывающих регуляторное влияние на дифференцировку нейрональных стволовых клеток. Транспозоны составляют основу доменных структур длинных некодирующих РНК, служат важными источниками микроРНК. Так как прионные болезни могут возникать в виде спорадических и наследственных случаев, а на восприимчивость к заболеванию влияет полиморфизм в белок-кодирующих генах и генах микроРНК, можно предположить роль специфического состава и особенностей функционирования транспозонов в их патогенезе. Активация транспозонов в головном мозге на определенных стадиях развития, а также под действием стресса отражается в характере экспрессии специфических некодирующих РНК, способных катализировать переход белка PrP^C в PrP^{Sc}. Исследование в данном направлении может стать основой для таргетной терапии прионных болезней с использованием микроРНК в качестве мишеней.

Ключевые слова: головной мозг; длинные некодирующие РНК; метилирование; микроРНК; прионы; регуляция; стволовые клетки; трансмиссивные губчатые энцефалопатии.

Interrelation of prions with non-coding RNAs

R.N. Mustafin¹✉, E.K. Khusnutdinova^{1, 2}

¹ Bashkir State University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center RAS, Ufa, Russia

Prions are alternative infectious conformations of some cellular proteins. For the protein PrP^C (PrP – prion protein, C – common), the prion conformation called PrP^{Sc} (Sc – scrapie) is pathological. For example, the PrP^{Sc} prion causes in mammals transmissible spongiform encephalopathies, which accumulate in the brain tissues as PrP^{Sc} aggregates with amyloid properties. MicroRNAs and long non-coding RNAs can be translated into functional peptides. These peptides can have a regulatory effect on genes from which their non-coding RNAs are transcribed. We hypothesized that prions, like peptides, due to the presence of specific domains, can also activate certain non-coding RNAs. Some of the activated non-coding RNAs can catalyze the formation of new prions from normal protein, playing a role in the pathogenesis of prion diseases. This assumption is supported by an association of microRNA alleles with the development of the disease, which indicates a role of specific sequences of non-coding RNAs in the catalysis of prion formation. In the brain tissues of patients with prion diseases, as well as in exosomes containing the abnormal isoform of PrP^{Sc}, changes in the levels of microRNA were observed. A possible cause is the interaction of the spatial domains of PrP^{Sc} with the sequences of the non-coding RNA genes, which causes a change in their expression. MicroRNAs, in turn, affect the synthesis of long non-coding RNAs. We hypothesize that long noncoding RNAs and possibly microRNAs can interact with PrP^C, catalyzing its transformation into PrP^{Sc}. As a result, the number of PrP^{Sc} increases exponentially. In the brain of animals and humans, transposon activity is observed, which has a regulatory effect on the differentiation of neuronal stem cells. Transposons form the basis of domain structures of long non-coding RNAs. In addition, they are important sources of microRNA. Since prion diseases can arise as sporadic and hereditary cases, and hereditary predisposition is important for the development of the pathology, we hypothesize a role of individual features of activation of transposons in the pathogenesis of prion diseases. The activation of transposons in the brain at certain stages of development, as well as under the influence of stress, is reflected in the peculiarities of expression of specific non-coding RNAs that are capable of catalyzing the transition of the PrP^C protein to PrP^{Sc}.

УДК 612.82:577.214.5

Поступила в редакцию 14.01.2018

Принята к публикации 14.02.2018

© АВТОРЫ, 2018



e-mail: ruji79@mail.ru

Research in this direction can be the basis for targeted anti-microRNA therapy of prion diseases.

Key words: brain; long noncoding RNA; methylation; microRNA; prions; regulation; stem cells; transmissible spongiform encephalopathies.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Взаимосвязь прионов с некодирующими РНК. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):415-424. DOI 10.18699/VJ18.377

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Interrelation of prions with non-coding RNAs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):415-424. DOI 10.18699/VJ18.377

Термин «прион» создан для обозначения белковых инфекционных частиц (proteinaceous infectious particles – *prion*), способных вызывать прионные болезни или трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ) у млекопитающих. Одним из примеров является белок PrP^{Sc} (PrP – от англ. prion protein, Sc – scrapie – скреппи), богатый β-слоями, образующийся путем конформационного преобразования белка приона клеток из нормальной третичной структуры PrP^C (C – common – обычный). Однако PrP – не единственный белок, формирующий прионы. Не все прионы связаны с патогенезом. В научной литературе термин «прион» использовался для обозначения самораспространяющихся альтернативных конформаций белков. В этом отношении многие амилоиды могут в конечном счете определяться как прионы. Однако в другом смысле понятие «прион» влечет за собой доказанную трансмиссивность (Harbi, Harrison, 2014).

Название «амилоид» стало применяться с 1838 г. немецким ботаником М. Шлейденом для описания крахмальной (amylum – лат., крахмал) составляющей растений. В 1854 г. Р. Вирхов использовал этот термин ввиду своеобразной реакции депозитов в нервной системе с йодом, ошибочно считая, что такие субстанции идентичны крахмалу. В дальнейшем выяснилось, что депозиты имеют белковую природу, однако термин «амилоид» не был изменен (Kyle, 2001).

Амилоидные фибриллы – это нитевидные самоорганизующиеся агрегаты пептидов или белков, содержащие поперечные β-структуры. Лентообразные β-слои простираются по длине фибрилл, в которых β-нити проходят перпендикулярно направлению роста фибрилл и связаны между собой водородными связями. В типичных амилоидных фибриллах имеется два и более поперечных β-слоя, уложенных друг на друга. Доказательства наличия поперечных β-структур в амилоидных фибриллах получены дифракцией волокон рентгеновскими лучами и электронами, электронной микроскопией и твердотельным ядерным магнитным резонансом. Амилоидные фибриллы – структурное состояние, которое полипептиды принимают при достаточно высоких концентрациях, если они не способны образовывать более сложные структуры, например складки для глобулярной структуры фермента, или не могут участвовать в биологическом функциональном супрамолекулярном комплексе (Tusko, 2014).

Формирование амилоида представляет интерес для медицинских исследований, так как в пораженной ткани многочисленных амилоидных болезней, включая диабет второго типа и нейродегенеративные болезни, такие

как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и ТГЭ, накапливаются амилоидные фибриллы (Tusko, 2014). Характерная черта ТГЭ – инфекционные свойства амилоидных белков прионов, вызывающих заболевание. ТГЭ относятся к группе прогрессирующих нейродегенеративных состояний, поражающих нервную систему человека и животных (Saba et al., 2012). У человека ТГЭ включают болезнь Крейтцфельда–Якоба (CJD), синдром Герстмана–Штрауслера–Шейнкера, фатальную семейную бессонницу (FFI) и куру, у овец – скреппи, у крупного рогатого скота – бычью губчатую энцефалопатию. Эффективная диагностика и лечение ТГЭ затрудняются отсутствием эффективных прижизненных диагностических методов, особенно в доклиническую стадию болезни (Bellingham et al., 2012). ТГЭ могут иметь генетическую этиологию, возникать спорадически без каких-либо известных факторов риска или мутаций генов, а также путем прямого заражения, например через пищу и контаминированный медицинский инструментарий (таблица) (Saba et al., 2012; Mabbott, 2017).

Клеточный прионный белок с нормальной третичной структурой PrP^C представляет собой сialogликопротеин с гликофосфатидилинозитольным якорем и характеризуется высоким уровнем экспрессии в центральной нервной системе (ЦНС), особенно в синапсах нейронов (Rubenstein et al., 2018). PrP^C имеет молекулярную массу 30–35 кДа и кодируется геном *PRNP*. После синтеза PrP^C первоначально процессируется в комплексе Гольджи до его экспрессии на плазматической мембране. Вторичная структура С-концевого домена PrP^C содержит три α-спирали и короткий двуцепочечный β-складчатый слой (Mabbott, 2017). Глицин-богатый N-концевой домен содержит область октапептидного повтора, состоящую из четырех смежных копий высококонсервативной последовательности PHGGGWGQ. Предполагается, что N-концевой домен PrP^C с нарушенной упорядоченностью играет роль в модулировании физиологической функции PrP^C, а также в образовании патологических реакций при прионных болезнях. Во множестве исследований продемонстрировано, что N-концевой домен PrP может взаимодействовать с широким спектром лигандов, таких как богатые β-слоями конформеры (в частности, PrP^{Sc} при ТГЭ и пептид Aβ42 при болезни Альцгеймера), ионами металлов (Cu²⁺ и Zn²⁺), липидами, гликозаминогликанами (которые придают белку разнообразные, порой противоположные свойства активности, включая защиту от окислительного стресса и посредничество токсических эффектов PrP^{Sc}), и нуклеиновыми кислотами (Eigenbrod et al., 2017). Можно

Прионные болезни человека и животных, по (Mabbott, 2017)

Болезнь	Пораженный вид	Путь передачи
Ятрогенная болезнь Крейтцфельдта–Якоба	Человек	Случайная медицинская контаминация
Спорадическая болезнь Крейтцфельдта–Якоба	Человек	Соматические мутации или спонтанные конверсии PrP ^C в PrP ^{Sc}
Вариантная болезнь Крейтцфельдта–Якоба	Человек	Поедание зараженной пищи или переливание зараженной крови
Семейная болезнь Крейтцфельдта–Якоба	Человек	Герминативные мутации в гене <i>PRNP</i>
Синдром Герстмана–Штрауслера–Шейнкера	Человек	»
Куру	Человек	Ритуальный каннибализм
Фатальная семейная бессонница	Человек	Герминативные мутации в гене <i>PRNP</i>
Коровье бешенство	Крупный рогатый скот	Поедание зараженной пищи
Скрепи	Овца, козел, муфлон	Поедание зараженной пищи, горизонтальная и вертикальная передача
Хроническая изнуряющая болезнь	Лось, олень	»
Трансмиссивная энцефалопатия норок	Норка	Поедание зараженной пищи
Губчатая энцефалопатия кошек	Кошка	»
Губчатая энцефалопатия экзотических копытных	Антилопа, большой куду	»

предположить, что измененная конформация прионного белка PrP^{Sc} влечет за собой нарушение упорядоченности N-концевого домена, модулируя его физиологическую функцию и позволяя воздействовать на гены некодирующих РНК (нкРНК) путем взаимодействия с регуляторными последовательностями или регуляторами их генов, активируя их подобно пептидам, образуемым при трансляции нкРНК. В редких случаях активируемые таким образом специфические нкРНК могут использоваться в качестве кофактора для конформационных превращений PrP^C в PrP^{Sc}. Но если такое явление происходит, то возникает цепная реакция с экспоненциальным ростом количества PrP^{Sc}, что характерно для прионных болезней. Однако вероятность активации специфических нкРНК, которые наиболее оптимально могут способствовать конформационным переходам PrP^C в PrP^{Sc}, ничтожно мала, с учетом длительного инкубационного периода болезни, что также характерно для прионных болезней.

В центральной нервной системе PrP^C при физиологическом развитии играет важную роль в поддержании гомеостаза миелина путем взаимодействия с G-белковым рецептором Gpr126 (известным как Adgrg6) в шванновских клетках. Сообщалось также о многих других функциях PrP^C в ЦНС, включая регуляцию циркадных ритмов, синаптическую передачу, познание, сигнальную трансдукцию, регуляцию апоптоза и защиту от окислительного стресса. Кроме того, PrP^C экспрессируется во многих клеточных популяциях в иммунной системе и вторичных лимфоидных органах. Хотя у мышей с истощением PrP^C не обнаруживается явного иммунодефицита, PrP^C может играть роль в активации клеток, дифференцировке Т-клеток, межклеточных взаимодействиях и фагоцитозе (Mabbott, 2017). PrP^C является субстратом кальпаина (активируемая кальцием цистеиновая фосфатаза, кото-

рая обычно подвергается контролируемой активации) и может быть нейротоксичным при патологическом процессинге с накоплением в цитозоле (Rubenstein et al., 2018). Обнаружено, что клеточная форма прионного белка PrP^C действует как рецептор для амилоидных фибрилл α -синуклина, облегчая их интернализацию и эндоцитоз. Такие реакции происходят путем прямых взаимосвязей между фибриллами α -синуклина и N-концевым доменом PrP^C. В клеточных линиях, экспрессирующих патологическую форму PrP^{Sc}, связывание PrP^C с α -синуклеиновыми фибриллами предотвращает формирование и накопление PrP^{Sc}, так как PrP^C становится недоступным в качестве субстрата для патологического преобразования под воздействием PrP^{Sc} (De Cecco, Legname, 2018).

При ТГЭ обнаруживаются изменения во вторичной, третичной и четвертичной структурах молекулы PrP, во время которых увеличивается количество β -складчатых слоев. Эти изменения оказывают сильное влияние на физико-химические и биологические характеристики PrP, поскольку специфическая для болезни изоформа PrP^{Sc} нейротоксична, относительно устойчива к расщеплению протеиназой и накапливается в пораженных тканях в виде нерастворимых агрегатов. Точные механизмы, с помощью которых происходят эти конформационные и биологические изменения, не известны. Но была продемонстрирована необходимость в дополнительных молекулах шаперонов, таких как липиды, протеогликаны и РНК (Mabbott, 2017). Прогрессирование ТГЭ связано с экспоненциальным ростом превращений нормального клеточного белка PrP^C в аномальную изоформу PrP^{Sc} (Saba et al., 2012). PrP^{Sc} характеризуется измененной третичной структурой молекулы, в которой α -спирали переходят в новую конформацию с β -слоями (Simoneau et al., 2015). Характерные гистопатологические изменения в ЦНС при

ТГЭ включают вакуолизацию головного мозга (ГМ), нейродегенерацию, микроглиоз, астроцитоз и патологическое накопление PrP^{Sc} (Mabbott, 2017).

Подобно другим нейродегенеративным процессам, характерным патологическим признаком ТГЭ является активированное состояние резидентных иммунных клеток ГМ, микроглии, а также повышенное количество астроцитов. Во многих случаях эта особенность может быть обнаружена до появления клинических симптомов и признаков нейродегенерации, таких как спонгиоз и гибель нейронов (Saba et al., 2012). Кроме PrP^{Sc}, некоторые элементы могут влиять на развитие ТГЭ или детерминировать клинический фенотип болезни и восприимчивость к прионной инфекции. Например, обнаружено, что аллельный вариант гена *PRNP*, который кодирует нормальный мембранный белок PrP^C, может участвовать в патогенезе ТГЭ. Выявлено, что полиморфизм *ZBTB38* гена *RASA2* (RAS p21 protein activator 2) ассоциирован с восприимчивостью к спорадической болезни Крейтцфельда–Якоба (англ. Creutzfeldt–Jakob Disease – CJD) в Великобритании. В Китае установлена выраженная ассоциация SNP *rs57095329* в miR-146a с восприимчивостью к фатальной семейной бессоннице (англ. Fatal Familial Insomnia, FFI) (Gao et al., 2018). Перспективным направлением считается исследование микроРНК при ТГЭ в связи с возможностью создания диагностических маркеров инфицированности животных, применяемых в пищевых целях. Так, в недавних исследованиях путем количественной ПЦР с обратной транскрипцией были проанализированы уровни кандидатных микроРНК в плазме крови овец, пораженных скрепии. Обнаружена значительная ассоциация с этой болезнью повышенных уровней miR-342-3p и miR-21-5p (Sanz Rubio et al., 2017).

Роль микроРНК в патогенезе прионных болезней

При ТГЭ наблюдается дерегуляция определенных микроРНК в инфицированных прионом тканях ГМ (Bellingham et al., 2012). Проведены экспериментальные исследования на модельных животных для определения роли микроРНК в патогенезе прионных болезней. Обнаружена дерегуляция 15 микроРНК в ГМ мышей, инфицированных прионом. Наблюдалось усиление экспрессии более чем в 2.5 раза для miR-342-3p, miR-320, let-7b, miR-328, miR-128, miR-139-5p, miR-146a, а также снижение более чем в 2.5 раза уровней miR-338-3p и miR-337-3p. Из этих микроРНК дерегуляция при нейродегенеративных процессах ранее определена только для miR-128, что говорит о консервативном, специфическом для болезни, паттерне дифференциальной экспрессии микроРНК, ассоциированной с индуцированной прионом нейродегенерацией. Для данных микроРНК предсказано множество потенциальных мишеней, включая 119 генов, регуляция которых нарушалась при скрепии у мышей (Saba et al., 2008). Установлена гиперэкспрессия miR-146a в тканях ГМ инфицированных прионом мышей одновременно с образованием депозитов прионов и появлением активированной микроглии. В ответ на воздействие miR-146a определены значительные изменения транскрипции, включая медиаторы провоспалительных транскрипционных факторов,

ядерный фактор каппа-В (NF-κB) и сигнальные пути JAK-STAT. Анализ микрочипов позволил предсказать роль miR-146a в регуляции морфологических изменений в состоянии активации микроглии, а также фагоцитарных медиаторов окислительных всплесков, таких как CYBA и NOS3. На основании полученных результатов предложена роль miR-146a в качестве мощного модулятора функции микроглии путем регуляции активированного состояния во время индуцированной прионом нейродегенерации (Saba et al., 2012). Обнаружено усиление экспрессии has-miR-342-3p и has-miR-494 в ГМ инфицированных прионом макаков, моделей CJD человека, по сравнению с контрольными группами. Повышенная экспрессия has-miR-342-3p определена в ГМ людей со спорадической CJD. Предполагается использование данной микроРНК в качестве диагностического маркера ТГЭ (Montag et al., 2009).

Ранние изменения при ТГЭ, наблюдаемые в тканях ГМ, включают уменьшение числа синапсов и сокращение дендритных шипов с последующей редукцией длины и разветвлений аксонов. Данные патологические состояния наблюдаются в доклинических стадиях болезни и сопровождаются изменением экспрессии транскриптов, которые включают микроРНК. Обнаружено, что на ранних стадиях ТГЭ в нейронах CA1 гиппокампа возрастают уровни miR-16. Модулирование экспрессии miR-16 в зрелых нейронах гиппокампа путем экспрессии из лентивируса имитирует наблюдаемые *in vivo* редукции длины и разветвлений аксонов, приводящих к нейродегенерации. Сделано предположение, что повышенный уровень экспрессии miR-16 в нейронах в доклиническую стадию ТГЭ, вызывающий изменение регуляции MAPK/ERK путей, участвует в патогенезе прионной болезни (Burak et al., 2018). Основные молекулярные механизмы, приводящие к редукции синапсов нейронов гиппокампа и коры ГМ, при ТГЭ не выявлены. Однако оказалось, что микроРНК, многие из которых обогащают синапсы, регулируют локальный синтез белка в быстром ответе на прионные стрессоры. Были проанализированы особенности процессинга микроРНК, изолированных из синаптонейросом в доклинической и клинической стадиях ТГЭ. В доклинической стадии в нейронах наблюдалось обогащение miR-124a-3p, miR-136-5p, miR-376a-3p. В более позднем периоде ТГЭ было обнаружено увеличение уровней микроРНК, которые считаются дерегулированными в ГМ у мышей, инфицированных прионами, а также на моделях болезни Альцгеймера. К данным микроРНК относятся: miR-146a-5p, miR-142-3p, miR-143-3p, miR-145a-5p, miR-451a, miR-let-7b, miR-320, miR-150-5p. В клинической стадии ТГЭ наблюдалось снижение ряда микроРНК, в том числе почти все родственные семейству miR-200 (miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-141-3p, miR-429-3p) и кластер 182 (miR-182-5p, miR-183-5p) (Boese et al., 2016).

В клетках PrP^C и его аномальная инфекционная форма PrP^{Sc} обнаруживаются ассоциированными с экзосомами – небольшими, размером 50–130 нм, везикулами, которые высвобождаются из клеток. Эти экзосомы содержат также микроРНК, используемые для идентификации микроРНК-сигнатур в диагностике ТГЭ. Исследован профиль

микроРНК в экзосомах, выделенных из инфицированных прионом нервных клеток, и выявлены повышенные уровни let-7b, let-7i, miR-128a, miR-21, miR-222, miR-29b, miR-343-3p, miR-424 по сравнению с нормой. Таким образом, в экзосомах нейронов инфицированных прионом животных наблюдается отчетливая взаимосвязь с микроРНК, что может быть использовано для диагностики ТГЭ и объяснения возможных патогенетических механизмов болезни (Bellingham et al., 2012). Помимо исследования уровней экспрессии, проведен также анализ SNP генов микроРНК, участвующих в дисрегуляции нейронов гиппокампа CA1 на мышах в ранней доклинической стадии ТГЭ. В результате выявлена выраженная ассоциация SNP микроРНК, перекрывающих сайты связывания микроРНК с 3'-UTR генов, кодирующих GABA-рецепторные субъединицы (Saba et al., 2014). Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что в развитии ТГЭ имеет значение особенность последовательностей нкРНК, что отражается на их пространственной конфигурации и возможном взаимодействии с белковыми доменами PrP^C с участием в катализе его конформационного преобразования в PrP^{Sc}. В ряде исследований для этих переходов выявлена необходимость в дополнительных молекулах шаперонов, таких как РНК (Mabbott, 2017). Изменение последовательностей генов нкРНК может также иметь значение для возможного взаимодействия с ними изоформ PrP^{Sc}, вызывающего регуляторный эффект подобно пептидам, получаемым путем трансляции нкРНК (Lv et al., 2016). Потенциальным участком для взаимодействия с генами нкРНК и их регуляторами может быть N-концевой домен PrP^C, нарушение упорядоченности которого (например, при конформационном превращении в PrP^{Sc}) играет роль в модулировании физиологических функций PrP. Предположение основано на том, что N-концевой домен PrP может взаимодействовать с широким спектром лигандов, включая последовательности нуклеиновых кислот (Eigenbrod et al., 2017). N-концевой домен нормального белка PrP^C взаимодействует с глобулярным доменом (Evans et al., 2016). Однако конформационные преобразования глобулярного домена PrP^C из α -спиралей в β -слои PrP^{Sc} могут вызвать значительные модификации N-концевого домена и возможность его взаимодействия с регуляторными последовательностями генов специфических нкРНК, продукты транскрипции которых потенциально способны катализировать конформационные превращения PrP^C в PrP^{Sc}. Это приводит к цепной реакции, так как N-концевые домены образованных PrP^{Sc}, в свою очередь, вновь активируют экспрессию нкРНК, катализирующих их превращения.

Регуляция некодирующих РНК продуктами собственной трансляции

Несмотря на название, некодирующие РНК могут транслироваться, а образуемые при этом пептиды обладают способностями регуляторных воздействий на белок-кодирующие гены (Lv et al., 2016). Более 10 % геномов всех живых организмов состоят из функциональных генов, содержащих короткие открытые рамки считывания (smORF) и кодирующих биоактивные пептиды (Saghatelian, Couso, 2015). При-микроРНК содержат также smORF и спо-

собны как к процессингу в зрелые микроРНК, так и к трансляции в пептиды. Образуемые функциональные пептиды, обозначаемые как miPEP, могут усиливать транскрипцию связанных с ними микроРНК (Couzigou et al., 2015). У арабидопсиса каждая 50-я микроРНК содержит smORF, необходимую для трансляции при-микроРНК в пептид. У растения *Medicago truncatula* из pri-miR171b синтезируется miPEP171b, у *Arabidopsis thaliana* из pri-miR165a синтезируется miPEP165a (Lauressergues et al., 2015). Биологическая активность miPEP доказана экспериментально. Более того, данные пептиды с успехом применяются для оптимизации агрономических свойств сельскохозяйственных растений. Уже внедрено в практику применение синтетического пептида miPEP172c, который активирует экспрессию miR172c, что стимулирует образование узелков в корневой системе сои и способствует урожайности за счет симбиотического взаимодействия с ризобиями (Couzigou et al., 2016).

Хотя длинные некодирующие РНК (днРНК) не содержат консервативных и длинных открытых рамок считывания (ORF), они также могут взаимодействовать с рибосомами и транслироваться в пептиды, обладающие функциональной ролью (Ruiz et al., 2014). Например, у животных днРНК транслируется в пептид миорегулин, который контролирует эффективность работы мышц. Миорегулин связывается с кальциевой АТФазой эндоплазматической сети (ЭДС) и оказывает регуляторное влияние на поглощение кальция, за счет чего и осуществляет свой контроль (Anderson et al., 2015). Из днРНК у животных синтезируется пептид DWORF, который также функционирует на ЭДС (Nelson et al., 2016). У растений из днРНК образуются различные пептиды, например пептид IPS1, который регулирует поглощение фосфатов; пептид ENOD40 участвует в симбиотических взаимосвязях с бактериями; пептиды COLDAIR и COOLAIR управляют временем цветения (Zhang et al., 2013).

Активность транспозонов и некодирующих РНК в головном мозге

НкРНК играют важную роль в управлении развитием ГМ и поддержании его работы в зрелых дифференцированных нервных клетках. Нейрогенез в гиппокампе управляется генными регуляторными сетями, транскрипционными факторами, днРНК и микроРНК. При этом днРНК могут играть ключевую роль в данных процессах (Deng et al., 2017). В экспериментальных исследованиях в ГМ мышей была выявлена экспрессия 849 разных днРНК, многие из которых перекрывались с белок-кодирующими генами, участвующими в функции нервной системы. При этом днРНК не являлись «транскрипционным шумом» или артефактами ремоделирования хроматина (Mercer et al., 2008). Большинство днРНК разделяли идентичную модель экспрессии с генами нейрогенеза, что говорит о роли днРНК в регуляции кортикогенеза за счет настройки экспрессии детерминантов соседних участков генома в нейронах (Aprea et al., 2013).

Наблюдается тесная взаимосвязь в функционировании нкРНК и транспозонов (TE – transposable elements) для регуляции дифференцировки стволовых клеток (СК), в том числе в нейрогенезе. Активация определенных TE

необходима как для поддержания плюрипотентности, так и для последовательной дифференцировки СК. Причем истощение специфических днРНК может привести к дисрегуляции ТЕ и полной остановке развития эмбриона. Например, истощение длинной некодирующей РНК *LincGET* вызывает полную остановку развития у мыши в поздней G2-фазе двуклеточной стадии. Эффект оказался обусловлен нарушением образования комплекса *LincGET* с белками ILF2, FUBP1, hnRNP-U, необходимого для цис-регуляторной активности LTR-содержащих ретро-ТЕ GLN, MERVL, ERVK (Wang et al., 2016). ТЕ могут использоваться в качестве генов днРНК. Например, для поддержания идентичности эмбриональных СК у человека ретро-ТЕ HERVH транскрибируется в ядерную днРНК (Lu et al., 2014). В эволюции ТЕ используются для образования функциональных доменов днРНК и встречаются в 83 % из них (Johnson, Guigo, 2014). Активность ТЕ в ГМ наблюдается не только в эмбриональном периоде, но и у взрослых людей (Faulkner, 2011), животных и в мозге дрозофилы (Richardson et al., 2014). Предполагается, что данная активность ТЕ является источником генетической гетерогенности нейронов развивающихся структур ГМ (Upton et al., 2015), так как ТЕ обладают регуляторной ролью за счет образования из их транскриптов функциональных нкРНК (Gim et al., 2014).

ТЕ служат также важными источниками микроРНК животных (Borchert et al., 2011; Gim et al., 2014) и растений (Li et al., 2011; Lorenzetti et al., 2016), что говорит об универсальности и консервативности в эволюции данного феномена. В то же время в ГМ экспрессируются до 40 % всех микроРНК, которые оказывают регуляторное воздействие на функционирование нервных клеток. Многие микроРНК влияют на нейромедиаторные системы. Определенные пре-микроРНК экспрессируются на высоком уровне в дендритах нейронов, где они локально процессируются в зрелые микроРНК, регулируя трансляцию мРНК. К ним относятся обогащенные в синапсах микроРНК: miR-200c, miR-339, miR-332, miR-318, miR-29a, miR-7 и miR-137. МикроРНК miR-16, miR-221, miR-204, miR-15b экспрессируются на более высоких уровнях в пресинапсах аксонов по сравнению с телами нейронов (Dwivedi, 2014). Важными источниками микроРНК являются неавтономные ДНК транспозоны MER (medium reiteration frequency repeats). У эмбрионов мышей на 14-й день развития выявлена выраженная активация ТЕ MER130, вызывающая образование неокортекса. Неавтономные ТЕ MER130 оказались прилегающими к важнейшим генам коры ГМ, функционируя в качестве энхансеров (Notwell et al., 2015). Тесная всесторонняя взаимосвязь ТЕ с нкРНК может говорить о неслучайности обнаруживаемой активности ТЕ в нейрональных СК, так как микроРНК и днРНК осуществляют регуляторное воздействие на экспрессию генов при дифференцировке клеток. Предполагается, что соматические ретротранспозиции ТЕ при нейрогенезе служат потенциальными источниками генотипических вариаций нейронов, необходимых для формирования структур ГМ. Наибольшая активность ТЕ обнаружена в центре нейрогенеза – гиппокампе, при секвенировании отдельных клеток которого установлено в среднем 13.7 соматических инсерций LINE-1 на один нейрон (Upton et al., 2015).

Выявлено, что дисрегуляция микроРНК при ТГЭ наблюдается в нейронах гиппокампа (Burak et al., 2018), где обнаружена наибольшая активность ТЕ (Deng et al., 2017), которая, как предполагается, служит основанием гетерогенности нейронов, необходимой для формирования различных структур ГМ. Можно предположить, что особенности функционирования определенных нкРНК, взаимосвязанных с ТЕ в регуляции работы ГМ, могут иметь значение в возникновении и прогрессировании ТГЭ. Возможной причиной является доступность определенных участков генома, содержащих последовательности ТЕ и гены микроРНК, позволяющая взаимодействовать с ними доменам PrP^{Sc}. Это может вызвать каскад взаимозависимых процессов с геометрической прогрессией, а именно: усиление специфических микроРНК под влиянием PrP^{Sc} способно оказывать влияние на экспрессию определенных днРНК, которые, в свою очередь, могут взаимодействовать с нормальной изоформой PrP^C, катализируя ее переход в PrP^{Sc}. Не исключено, что сами микроРНК могут взаимодействовать с прионами в качестве кофакторов, вызывая их конформационные превращения. Конечно, вероятность подобных явлений чрезвычайно мала, но при их возникновении патологический процесс будет характеризоваться экспоненциальным ростом. Это согласуется как с эпидемиологией прионных болезней, так и с особенностями их развития (длительный инкубационный период и быстрое прогрессирование). Так как каждый вид животных отличается специфическим составом и расположением ТЕ в их геномах, что отражается в эпигенетических особенностях их функционирования (Мустафин, Хуснутдинова, 2017), то предложенный механизм патогенеза ТГЭ согласуется с видоспецифичной передачей заражений прионами.

Роль длинных некодирующих РНК в катализе белковых конформаций

Можно предположить, что ГМ является областью развития прионной болезни вследствие особенностей регуляции активности нервных клеток, отражающихся в экспрессии специфических микроРНК и днРНК под влиянием ТЕ. ДнРНК активно участвуют в управлении экспрессией генов, необходимых для развития ГМ. Например, lncRNA2393 способствует дифференцировке и распространению нейрональных СК в зубчатой извилине гиппокампа (Deng et al., 2017), где также наблюдается высокая активность ТЕ. ДнРНК взаимодействуют с микроРНК путем гибридизации с частично комплементарными последовательностями. При этом днРНК могут действовать как молекулярные губки за счет связывания микроРНК, снижая эффект их воздействия на целевые мРНК (Fitzgerald, Caffrey, 2014). ДнРНК могут катализировать различные молекулярные процессы самостоятельно в качестве рибозимов или, чаще, в составе РНП (рибонуклеопротеинов). Подобно белкам, днРНК обладают модульной пространственной организацией и содержат дискретные домены, в формировании которых важную роль играют ТЕ (Johnson, Guigo, 2014).

Для предположения возможного механизма катализа конформационного перехода нормального белка в прион под влиянием нкРНК можно рассмотреть сходные механизмы для прион-подобных доменов (PLD – prion-like

domains). PLD позволяют белку «функционально агрегировать», формируя комплексы более высокого порядка и микроскопически видимые гранулы РНП. Считается, что концентрация белков и РНК в ограниченном пространстве способствует более эффективным процессам генной регуляции. Биофизические свойства PLD-опосредованных взаимодействий могут объяснить сходные с жидкостью свойства гранул РНП, так как PLD, экспрессируемые *in vitro*, образуют гидрогели. PLD – это последовательности с низкой степенью сложности, обнаруженные в РНК-связывающих белках, ассоциированных с нейродегенеративной болезнью боковым амиотрофическим склерозом. PLD обогащены полярными аминокислотами и глицинами и имеют сходство с прионным белком дрожжей, которое можно определить с использованием скрытых моделей Маркова (Hennig, 2015). У многоклеточных животных PLD играют заметную роль в субклеточной организации цитоплазмы, особенно в отношении гомеостаза РНК. При исследовании 20000 белок-кодирующих генов человека при помощи алгоритма PLAAC (Prion-Like Amino Acid Composition) выявлено 240 генов (1.2 %), содержащих домен со структурным сходством с аннотированными прионными доменами дрожжей. Из 240 генов 72 (30 %) оказались РНК-связывающими, а 79 (33 %) – ДНК-связывающими. Некоторые из РНК-связывающих белков, содержащих PLD, включая атаксин 1, атаксин 2, TDP-43, FUS, TAF15, EWSR1, hnRNPA1, hnRNPA2, имеют важное значение в патогенезе ряда фатальных нейродегенеративных заболеваний, в том числе боковой амиотрофический склероз, лобно-теменную деменцию и спиноцеребеллярную атаксию (March et al., 2016). PLD оказались также важными регуляторами взаимодействия бактериофагов с прокариотами. Они могут быть обнаружены у всех бактериофагов различных групп бактерий и архей. Такие PLD участвуют в прикреплении и проникновении фага в клетку, а также в его размножении (Tetz G., Tetz V., 2017). Это говорит об универсальности феномена PLD в природе.

Области с низкой сложностью (LCR – low complexity regions) в отношении белков представляют собой последовательности, которые имеют общее низкое разнообразие аминокислотных остатков по сравнению с областями с высокой сложностью. LCR могут различаться по степени их повторяемости (периодические или аperiodические мотивы) и их составу (гомогенные или гетерогенные). К LCR относятся микро- и минисателлиты; tandemные, диспергированные и простые повторяющиеся последовательности (ПП), гомополимеры, гетерополимеры в геномах, а также ПП аминокислот в белках (Battistuzzi et al., 2016). Примером ПП аминокислот в LCR могут быть глутамин/аспарагин-богатые (Q/N-богатые) домены. Впервые связь прионных белков с LCR показали M.D. Michelitsch и J.S. Weissman (2000). Исследователи обнаружили, что Q/N-богатые домены имеют высокую склонность к образованию самораспространяющихся амилоидных фибрилл. Были проанализированы полные протеомные последовательности 31 вида организмов и несколько неполных протеомных последовательностей, которые изучались на предмет определения Q/N-богатых областей. Установлено, что Q/N-богатые домены встречаются в

гораздо большем количестве у эукариотических белков, они были отобраны в эволюции в качестве модульных доменов для взаимодействия белков с белками в виде «полярной молнии». Таким образом, показано, что прион-подобная регуляция функции протеинов у эукариот может быть нормальным процессом их регуляции с широким спектром функций (Michelitsch, Weissman, 2000). Прионы представляют собой инфекционные белки, и это их важнейшее свойство. Прион-подобный домен не имеет отношения к инфекционным свойствам прионов, однако отражает сходство аминокислотных последовательностей и склонность к агрегации, что позволяет рассматривать PLD в качестве возможной модели влияния нкРНК на конформационные переходы приона, так как ТГЭ могут возникать не только путем прямого заражения, но и спорадически, а также иметь генетическую этиологию (Saba et al., 2012; Mabbott, 2017). Кроме того, выявлена роль PLD в этиологии амилоидоза AA у животных, который, подобно прионным болезням, может быть трансмиссивным (Murakami et al., 2014).

PLD вовлечены в опосредованную регуляцию генов путем жидкофазных переходов, приводящих к формированию гранул РНП. Многие PLD в белках связаны с субъядерными телами, параспеклами, которые возникают вокруг днРНК. Белок RBM14 соединяет ключевые подкомплексы параспеклов путем взаимодействий, опосредованных их PLD. Для формирования параспеклов в клетке, в которых их эндогенные копии находятся в нокдауне, необходимы PLD белков RBM14 и FUS. Они формируют гидрогель с амилоид-подобными свойствами. Посредством PLD происходят жидкофазные переходы в формировании параспеклов, что подчеркивает значение данного тела в качестве модели для понимания патологических процессов нейродегенерации (Hennig et al., 2015).

В норме PLD позволяют белкам «функционально агрегировать», образуя комплексы более высокого порядка и различимые под микроскопом гранулы РНП. Концентрируемые белки и РНК в ограниченном пространстве приводят к более эффективным процессам генной регуляции. Биофизические свойства PLD-опосредованных взаимодействий могут объяснить жидкофазные свойства гранул РНП, так как экспрессируемые *in vitro* PLD образуют петлеподобные сети, проявляющиеся в виде гидрогелей. Эти гидрогели сходны с амилоидом, но отличаются от него, представляя собой функциональный амилоид. В основе открытия данного феномена лежит исследование РНК-связывающего белка FUS (Fused in Sarcoma), содержащего PLD со множеством повторов [G/S]Y[G/S]. Центральный тирозин в повторах FUS необходим для образования гидрогеля и стресс-гранул в цитоплазме. Подобно цитоплазматическим РНП-гранулам, ядерные тела также формируют комплексы без участия мембран и состоят из молекул белков и РНК, избирательно завербованных на основе белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий. Параспеклы – ядерные тела, которые образованы на основе днРНК NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1/MENε/β). Известно около 40 белков параспеклов – большинство из них РНК-связывающие белки, обогащенные мотивами распознавания РНК, цинковым

пальцем и К-гомологичным доменом. Возникновение параспеклов инициируется транскрипцией NEAT1 с последующим набором различных белков, которые координируют накопление структуры параспеклов. К генам, кодирующим белки параспеклов, относятся *FUS*, *TDP-43*, *SSI18L1*, *HNRNPA1*, *TAF15*, *EWSR1*. Параспеклы являются чувствительными к стрессу структурами, индуцируемыми вирусными инфекциями, ингибированием протеосомы и дифференцировкой. Они влияют на экспрессию генов путем удержания РНК в ядре инвертированными повторами и путем секвестрации определенных факторов транскрипции (Hennig et al., 2015).

В экспериментах *in vitro* показан синергизм между эффектами РНК и амплификацией PrP^{Sc}. При этом наиболее успешными для конверсии в прионы оказались мелкие фрагменты РНК, возникающие под действием ультразвука (Gonzalez-Montalban et al., 2011), что позволяет предположить роль микроРНК в качестве возможных катализаторов перехода PrP^C в PrP^{Sc}. В исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что РНК действуют как кофакторы для формирования *de novo* высоких уровней инфекционных прионов, способствуя спонтанному рефолдингу PrP в патогенную изоформу (Timmes et al., 2013).

В исследованиях *in vitro* исследована роль РНК в качестве штамм-специфичных компонентов инфекционных прионов. Обнаружено, что воздействие РНКазы снижает активность конверсии PrP^{Sc} путем циклической амплификации белковой диссоциации (PMCA) в зависимости от штаммов. Добавление РНК восстанавливало эффективность конверсии PMCA. Полученные результаты позволили исследователям предположить, что молекулы РНК могут служить катализаторами репликации прионов, а вариативные возможности отдельных штаммов прионов для использования разных кофакторов способны объяснить специфические для штаммов зависимости от РНК (Saa et al., 2012).

Поиск предполагаемого фактора, способствующего инфекционности PrP^{Sc} амилоида, проведен в исследовании (Simoneau et al., 2015). В экспериментах было выявлено, что первоначально непатогенный прионный белок гесPrP, эквивалентный PrP^C, способен инициировать прионную болезнь у хомячков за счет превращения в прион-подобную конформацию (богатую β-слоями) в присутствии РНК, очищенных от ассоциированных со скрейпи фибрилл. Анализ инфекционной смеси гесPrP-РНК выявил наличие двух популяций малых РНК размерами 27 и 55 нуклеотидов. Результаты показали четкую взаимосвязь между специфическими РНК и свойствами инфекционности прионного амилоида (Simoneau et al., 2015).

Таким образом, появляется все больше доказательств роли специфических нкРНК в патогенезе прионных болезней. Так как важными источниками днРНК и микроРНК являются ТЕ, можно предположить, что индивидуальный состав и специфические изменения активации транспозонов в онтогенезе могут быть необходимым звеном для развития ТГЭ, а также других церебральных протеинопатий, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, для которых характерно структурное превращение специфических белков хозяина в новые конформации, богатые β-слоями.

Заключение

Предполагается, что одним из механизмов патогенеза прионных болезней служит возможность взаимодействия третичной структуры прионов с последовательностями генов определенных нкРНК. Такое взаимодействие может иметь сходство с саморегуляцией нкРНК продуктами собственной трансляции. Обнаружено, что нкРНК могут транслироваться, а образуемые пептиды оказывают выраженное регуляторное воздействие на гены этих нкРНК. Ассоциация полиморфизма микроРНК с развитием прионных болезней, а также изменение экспрессии определенных нкРНК при ТГЭ позволяют сделать предположение, что специфические некодирующие РНК способны катализировать переход белка PrP^C в изоформу PrP^{Sc}. Таким образом, оптимальные взаимодействия PrP^{Sc} с генами определенных нкРНК могут вызвать экспоненциальный рост их количества, если образуемые нкРНК или косвенные продукты их взаимодействий способны катализировать превращение PrP^C в изоформу PrP^{Sc}. Активация генов микроРНК доменами прионов, вероятно, потенцирует образование микроРНК, регуляция экспрессии определенных генов которыми также может стимулировать конформационные переходы PrP. Этим можно объяснить видоспецифический характер прионных инфекций, длительный инкубационный период и быстрое прогрессирование ТГЭ. В патогенезе ТГЭ предполагается роль ТЕ, служащих основой для дифференцировки нейрональных стволовых клеток гиппокампа под влиянием нкРНК, источниками которых могут служить ТЕ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o. [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-o. (in Russian)]
- Anderson D.M., Anderson K.M., Cang C.L., Makarewicz C.A., Nelson B.R., McAnally J.R., Kasaragod P., Shelton J.M., Liou J., Bassel-Duby R., Olson E.N. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. Cell. 2015;160:595-606.
- Apra J., Prenninger S., Dori M., Ghosh T., Monasor L.S., Wessendorf E., Zocher S., Massalini S., Alexopoulou D., Lesche M., Dahl A., Groszer M., Hiller M., Calegari F. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. EMBO J. 2013;32(24):3145-3160.
- Battistuzzi F.U., Schneider K.A., Spencer M.K., Fisher D., Chaudhry S., Escalante A.A. Profiles of low complexity regions in Apicomplexa. BMC Evol. Biol. 2016;16:47. DOI 10.1186/s12862-016-0625-0.
- Bellingham S.A., Coleman B.M., Hill A.F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. Nucleic Acids Res. 2012;40(21):10937-10949.
- Boese A.S., Saba R., Campbell K., Majer A., Medina S., Burton L., Booth T.F., Chong P., Westmacott G., Dutta S.M., Saba J.A.,

- Booth S.A. MicroRNA abundance is altered in synaptoneurosomes during prion disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016;71:13-24.
- Borchert G.M., Holton N.W., Williams J.D., Hernan W.L., Bishop I.P., Dombosky J.A., Elste J.E., Gregoire N.S., Kim J.A., Koehler W.W., Lengerich J.C., Medema A.A., Nguyen M.A., Ower G.D., Rarick M.A., Strong B.N., Tardi N.J., Tasker N.M., Wozniak D.J., Gatto C., Larson E.D. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive-element origins. *Mob. Genet. Elements.* 2011;1(1):8-17.
- Burak K., Lamoureux L., Boese A., Majer A., Saba R., Niu Y., Frost K., Booth S.A. MicroRNA-16 targets mRNA involved in neurite extension and branching in hippocampal neurons during presymptomatic prion disease. *Neurobiol. Dis.* 2018;112:1-13. DOI 10.1016/j.nbd.2017.12.011.
- Couzigou J.M., Andre O., Cuillotin B., Alexandre M., Comier J.P. Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *New Phytol.* 2016;211(2):379-381.
- Couzigou J.M., Lauressergues D., Becard G., Comier J.P. miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the role of miRNAs in plant biology. *RNA Biol.* 2015;12:1178-1180.
- De Cecco E., Legname G. The role of the prion protein in the internalization of α -synuclein amyloids. *Prion.* 2018;12(1):23-27. DOI 10.1080/19336896.2017.1423186.
- Deng B., Cheng X., Li H., Qin J., Tian M., Jin G. Microarray expression profiling in the denervated hippocampus identified long non-coding RNAs functionally involved in neurogenesis. *BMC Mol. Biol.* 2017;18(1):15. DOI 10.1186/s12867-017-0091-2.
- Dwivedi Y. Emerging role of microRNAs in major depressive disorder: diagnosis and therapeutic implications. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2014;16(1):43-61.
- Eigenbrod S., Frick P., Bertsch U., Mitteregger-Kretschmar G., Mielke J., Maringer M., Piening N., Hepp A., Daude N., Windl O., Levin J., Giese A., Sakthivelu V., Tatzelt J., Kretschmar H., Westaway D. Substitutions of PrP N-terminal histidine residues modulate scrapie disease pathogenesis and incubation time in transgenic mice. *PLoS ONE.* 2017;12(12):e0188989.
- Evans E.G., Pushie M.J., Markham K.A., Lee H.W., Millhauser G.L. Interaction between prion protein's cooper-bound octarepeat domain and charged C-terminal pocket suggests a mechanism for N-terminal regulation. *Structure.* 2016;24(7):1057-1067.
- Faulkner G.J. Retrotransposons: mobile and mutagenic from conception to death. *FEBS Lett.* 2011;585(11):1589-1594.
- Fitzgerald K.A., Caffrey D.R. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2014;26:140-146.
- Gao C., Shi Q., Wei J., Zhou W., Xiao K., Wang J., Shi Q., Dong X.P. The associations of two SNPs in miRNA-146a and one SNP in ZBTB38-RASA2 with the disease susceptibility and the clinical features of the Chinese patients of sCJD and FFI. *Prion.* 2018;12(1):34-41. DOI 10.1080/19336896.2017.1405885.
- Gim J., Ha H., Ahn K., Kim D.S., Kim H.S. Genome-wide identification and classification of microRNAs derived from repetitive elements. *Genomics Inform.* 2014;12(4):261-267.
- Gonzalez-Montalban N., Makarava N., Savtchenko R., Baskakov I.V. Relationship between conformational stability and amplification efficiency of prions. *Biochemistry.* 2011;50(37):7933-7940.
- Harbi D., Harrison P.M. Classifying prion and prion-like phenomena. *Prion.* 2014;8(2):pii27960.
- Hennig S., Kong G., Mannen T., Sadowska A., Kobelke S., Blythe A., Knott G.J., Iyer K.S., Ho D., Newcombe E.A., Hosoki K., Goshima N., Kawaguchi T., Hatters D., Trinkle-Mulcahy L., Hirose T., Bond C.S., Fox A.H. Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J. Cell. Biol.* 2015;210(4):529-539.
- Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA.* 2014;20(7):959-976.
- Kyle R.A. Amyloidosis: a convoluted story. *Br. J. Haematol.* 2001;114(3):529-538.
- Lauressergues D., Couzigou J.M., Clemente H.S., Martinez Y., Dunaand C., Becard G., Comier J.P. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature.* 2015;520(7545):90-93.
- Li Y., Li C., Xia J., Jin Y. Domestication of transposable elements into MicroRNA genes in plants. *PLoS ONE.* 2011;6:e19212.
- Lorenzetti A.P., A de Antonio G.Y., Paschoal A.R., Domingues D.S. Plant TE-MIR DB: a database for transposable element-related microRNAs in plant genomes. *Funct. Integr. Genomics.* 2016;16:235-242.
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P.E., Goke J., Bourque G., Ng H.H. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014;21(4):423-425.
- Lv S., Pan L., Wang G. Commentary: primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1436.
- Mabbott N.A. How do PrP^{Sc} prions spread between host species, and within hosts? *Pathogens.* 2017;6(4). pii: E60. DOI 10.3390/pathogens6040060.
- March Z.M., King O.D., Shorter J. Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res.* 2016;1647:9-18.
- Mercer T.R., Dinger M.E., Sunkin S.M., Mehler M.F., Mattick J.S. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(2):716-721.
- Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(22):11910-11915.
- Montag J., Hitt R., Opitz L., Schulz-Schaeffer W.J., Hunsmann G., Motzkus D. Upregulation of miRNA hsa-miR-342-3p in experimental and idiopathic prion disease. *Mol. Neurodegener.* 2009;4:36. DOI 10.1186/1750-1326-4-36.
- Murakami T., Ishiguro N., Haguchi K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet. Pathol.* 2014;51(2):363-371.
- Nelson B.R., Makarewich C.A., Anderson D.M., Winders B.R., Trounpe C.D., Wu F., Reese A.L., McAnally J.R., Chen X., Kevalali E.T., Cannon S.C., Houser S.R., Bassel-Duby R., Olson E.N. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science.* 2016;351(6270):271-275.
- Notwell J.H., Chung T., Heavner W., Bejerano G. A family of transposable elements co-opted into developmental enhancers in the mouse neocortex. *Nat. Commun.* 2015;6:6644.
- Richardson S.R., Morell S., Faulkner G.J. L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. *Annu. Rev. Genet.* 2014;48:1-27.
- Rubenstein R., Wang K.K., Chiu A., Grinkina N., Sharma D.R., Agarwal S., Lin F., Yang Z. PrPC expression and calpain activity independently mediate the effects of closed head injury in mice. *Behav. Brain Res.* 2018;340:29-40.
- Ruiz-Orera J., Messegue X., Subirana J.A., Alba M.M. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *Elife.* 2014;3:e03523. DOI 10.7554/eLife.03523.
- Saa P., Sferrazza G.F., Ottenberg G., Oelschlegel A.M., Dorsey K., Lasmezas C.I. Strain-specific role of RNAs in prion replication. *J. Virol.* 2012;86(19):10494-10504.
- Saba R., Goodman C.D., Huzarewich R.L., Robertson C., Booth S.A. A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS ONE.* 2008;3:e3652.
- Saba R., Gushue S., Huzarewich R.L., Manguiat K., Medina S., Robertson C., Booth S.A. MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e30832.
- Saba R., Medina S.J., Booth S.A. A functional SNP catalog of overlapping miRNA-binding sites in genes implicated in prion disease and other neurodegenerative disorders. *Hum. Mutat.* 2014;35(10):1233-1248.
- Saghatelian A., Couso J.P. Discovery and characterization of smORF encoded bioactive polypeptides. *Nat. Chem. Biol.* 2015;11(12):909-916.

- Sanz Rubio D., Lopez-Perez O., de Andres Pablo A., Bolea R., Osta R., Badiola J.J., Zaragoza P., Martin-Burriel I., Toivonen J.M. Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease. *J. Gen. Virol.* 2017;98(2):305-310.
- Simoneau S., Thomzig A., Ruchoux M.M., Vignier N., Daus M.L., Poggi A., Lebon P., Freire S., Durand V., Graziano S., Galeno R., Cardone F., Comoy E., Pocchiari M., Beekes M., Deslys J.P., Fournier J.G. Synthetic scrapie infectivity: interaction between recombinant PrP and scrapie brain-derived RNA. *Virulence.* 2015;6(2):132-144. DOI 10.4161/21505594.2014.989795.
- Tetz G., Tetz V. Prion-like domains in phagobiota. *Front. Microbiol.* 2017;8:2239.
- Timmes A.G., Moore R.A., Fischer E.R., Priora S.A. Recombinant prion refolded with lipid and RNA has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e71081.
- Tycko R. Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Sci.* 2014;23(11):1528-1539.
- Upton K.R., Gerhardt D.J., Jesuadian J.S., Richardson S.R., Sanchez-Luque F.J., Bodea G.O., Ewing A.D., Salvador-Palomegue C., van der Knaap M.S., Brennan P.M., Vanderver A., Faulkner G.J. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell.* 2015;161(2):228-239.
- Wang J., Li X., Wang L., Li J., Zhao Y., Bou G., Li Y., Jiao G., Shen X., Wei R., Liu S., Xie B., Lei L., Li W., Zhou Q., Liu Z. A novel long intergenic noncoding RNA indispensable for the cleavage of mouse two-cell embryos. *EMBO Rep.* 2016;17:1452-1470.
- Zhang J., Mujahid H., Hou Y., Nallamilli B.R., Peng Z. Plant long ncRNAs: a new frontier for gene regulatory control. *Am. J. Plant Sci.* 2013;4(5):1038-1045. DOI 10.4236/ajps.2013.45128.



Особенности протекания РНК-интерференции матричной металлопротеиназы 1 в эпидермальных кератиноцитах, обработанных интерлейкином 17А

Ю.А. Могутевцева¹, А.В. Мезенцев²✉, С.А. Брускин²

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

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

Матричные металлопротеиназы (ММП) играют важную роль в патогенезе псориаза, а также ряда других аутоиммунных заболеваний. Накопление интерлейкина 17А (ИЛ-17А) и других провоспалительных цитокинов в межклеточном матриксе приводит к индукции генов некоторых матричных металлопротеиназ, в частности *MMP1*. Рост протеолитической активности в межклеточном матриксе меняет его состав и свойства, а также способствует структурной реорганизации пораженного болезнью участка кожи. Структурная реорганизация, в свою очередь, приводит к изменению внешнего облика кожных покровов и образованию псориазных бляшек. Целью данной работы было исследовать влияние РНК-интерференции *MMP1* на биологические эффекты ИЛ-17А, такие как способность данного цитокина стимулировать миграцию и пролиферацию эпидермальных кератиноцитов человека, а также регулировать экспрессию генов, которые играют важную роль в процессе дифференцировки данного типа клеток. В работе использовали immortalized epidermal keratinocytes с «нокдаун» *MMP1* и без него – HaCaT-ММП1 и HaCaT-KTR соответственно. Для оценки пролиферации клеток сопоставляли кривые их роста. Миграцию клеток оценивали путем сравнения репрезентативных фотографических изображений, которые были получены через равные промежутки времени. Изменения в экспрессии генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Согласно полученным результатам, в клетках, обработанных ИЛ-17А, РНК-интерференция *MMP1* приводит к уменьшению экспрессии *MMP9* и *MMP12*, *FOSL1*, *CCNA2*, *IVL*, *KRT14* и *KRT17*, а также к увеличению экспрессии *MMP2*, *CCND1* и *LOR*. «Нокдаун» *MMP1* замедляет процесс миграции клеток и приводит к снижению скорости их пролиферации. Таким образом, проведенное нами исследование показало, что в присутствии ИЛ-17А РНК-интерференция *MMP1* обладает потенциальным терапевтическим эффектом, который может быть использован при лечении псориаза. «Нокдаун» ММП1 позволяет воздействовать на пролиферацию и миграцию клеток, а также контролировать экспрессию важных для патогенеза болезни генов (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9* и *MMP12*, *CCNA2*, *CCND1*, *KRT14* и *KRT17*).

Ключевые слова: матричная металлопротеиназа 1; псориаз; интерлейкин 17; малая ингибирующая РНК; РНК-интерференция.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Могутевцева Ю.А., Мезенцев А.В., Брускин С.А. Особенности протекания РНК-интерференции матричной металлопротеиназы 1 в эпидермальных кератиноцитах, обработанных интерлейкином 17А. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):425-432. DOI 10.18699/VJ18.378

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Mogulevtseva J.A., Mezentsev A.V., Bruskin S.A. RNAi-mediated silencing of matrix metalloproteinase 1 in epidermal keratinocytes influences the biological effects of interleukin 17A. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):425-432. DOI 10.18699/VJ18.378

УДК 575.113.36:616.517

Поступила в редакцию 22.11.2017

Принята к публикации 05.02.2018

© АВТОРЫ, 2018

✉ e-mail: mesentsev@vigg.ru

RNAi-mediated silencing of matrix metalloproteinase 1 in epidermal keratinocytes influences the biological effects of interleukin 17A

J.A. Mogulevtseva¹, A.V. Mezentsev²✉, S.A. Bruskin²

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

Matrix metalloproteinases (MMPs) are important for the pathogenesis of psoriasis and other autoimmune disorders. In the extracellular matrix, accumulation of proinflammatory cytokines, such as interleukin 17 (IL-17), causes an induction of several MMPs, including *MMP1*. MMPs change the composition and other properties of the extracellular matrix. These changes facilitate tissue remodeling and promote the development of psoriatic plaques. The aim of this study was to explore how *MMP1* silencing might influence the biological effects of IL-17A on migration and proliferation of human epidermal keratinocytes and the expression of genes involved in their division and differentiation. The experiments were performed with *MMP1*-deficient and control epidermal keratinocytes, HaCaT-MMP1 and HaCaT-KTR, respectively. Cell proliferation and migration were assessed by comparative analysis of the growth curves and scratch assay, respectively. To quantify cell migration, the representative areas of cell cultures were photographed at the indicated time points and compared to each other. Changes in gene expression were analyzed by real-time PCR. The obtained results demonstrated that *MMP1* silencing in the cells treated with IL-17A resulted in downregulation of *MMP9* and *MMP12*, *FOSL1*, *CCNA2*, *IVL*, *KRT14* and *KRT17* as well as upregulation of *MMP2*, *CCND1* and *LOR*. Moreover, *MMP1* silencing led to a decrease of cell proliferation and an impairment of cell migration. Thus, *MMP1*-deficiency in epidermal keratinocytes can be beneficial for psoriasis patients that experience an accumulation of IL-17 in lesional skin. Knocking down *MMP1* could influence migration and proliferation of epidermal keratinocytes *in vivo*, as well as help to control the expression of *MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, *MMP12*, *CCNA2*, *CCND1*, *KRT14* and *KRT17*, which are crucial for the pathogenesis of psoriasis.

Key words: matrix metalloproteinase 1; psoriasis; interleukin 17; small hairpin RNA; gene silencing.

Псориаз обыкновенный (*psoriasis vulgaris*) относится к числу наиболее распространенных хронических неинфекционных заболеваний кожи (Greb et al., 2016). В России заболеваемость псориазом составляет ~1.9 % (Хамаганова и др., 2015), что не превышает среднестатистического показателя (3 %) по данным Всемирной организации здравоохранения (Michalek et al., 2017). Наиболее характерный признак псориаза – образование на коже больного псориазических бляшек. В 21.1 и 5.7 % случаев болезнь характеризуется поражением ногтей и суставов соответственно (Рукавишникова, 2009; Мишина и др., 2013). Наконец, частыми спутниками псориаза (так называемыми коморбидными заболеваниями) являются болезни сердечно-сосудистой системы, диабет II типа, атеросклероз и др. (Батыршина, Садыкова, 2014).

На молекулярном уровне образование псориазических бляшек сопровождается изменениями в экспрессии нескольких тысяч генов (Zolotareno et al., 2016), в числе которых гены, связанные с дифференцировкой и пролиферацией эпидермальных кератиноцитов. В частности, происходит снижение экспрессии *KRT1*, *KRT5* и *KRT10* (Rao et al., 1996; Jin, Wang, 2014) и увеличение экспрессии *KRT14*, *KRT16*, *KRT17* (Al Robaee, 2010; Jin, Wang, 2014). Экспрессия маркеров поздней стадии дифференцировки – лорикрина (*LOR*) и филаггрина (*FLG*) – уменьшается, а экспрессия маркера ранней стадии дифференцировки – инволюкрина (*IVL*), наоборот, возрастает (Soboleva et al., 2014). Помимо этого повышается уровень экспрессии маркера пролиферации *MKI67* (Yazici et al., 2005) и происходят разнонаправленные изменения в экспрессии ряда циклинов. Так, экспрессия циклина D1 (*CCND1*) падает (Reischl et al., 2007), а экспрессия циклина A2 (*CCNA2*) увеличивается (Manczinger, Kemény, 2013).

Ключевую роль в патогенезе псориаза отводят интерлейкину 17A (ИЛ-17A). Будучи одним из медиаторов воспалительного процесса, ИЛ-17A стимулирует экспрессию провоспалительных хемокинов (*CCL20*, *CXCL1*, *CXCL2* и *CXCL8*), секреция которых в межклеточное пространство приводит к миграции активированных клеток иммунной системы в пораженный болезнью эпидермис и способствует стабилизации воспалительного процесса (Seo et al., 2017).

В последние несколько лет появились многочисленные данные об использовании терапевтических антител, специфичных к ИЛ-17A, для лечения псориаза (Canavan et al., 2016). По данным клинических испытаний, данная группа препаратов обладает высокой эффективностью, которая достигает 85–90 % при ее оценке с помощью индекса $PASI_{75}$, и низкой иммуногенностью. При этом необходимо упомянуть о наличии у блокаторов ИЛ-17A серьезных побочных эффектов, главный из которых – ослабление иммунитета. Кроме того, имеются противопоказания к применению блокаторов ИЛ-17A для больных с аллергическими реакциями, болезнью Крона и язвенным колитом. По этой причине вопрос о поиске других не менее эффективных методов лечения псориаза, в том числе основанных на принципиально иных подходах, остается по-прежнему актуальным. Одним из таких подходов в будущем может стать избирательная коррекция экспрессии важных для патогенеза псориаза генов при помощи специфичных shРНК.

Непосредственно нашей главной задачей является изучение роли матриксных металлопротеиназ, в частности матриксной металлопротеиназы 1 (ММП1) в патогенезе псориаза. Ранее нами было показано, что нарушения в экспрессии некоторых матриксных металлопротеиназ – *MMP1*, *MMP9* и *MMP12* – совпадают по времени с обострением болезни, а их содержание в пораженной болезнью ткани коррелирует со степенью ее тяжести (Стародубцева и др., 2011). Целью данной работы было прояснить, как именно РНК-интерференция *MMP1* может повлиять на миграцию и пролиферацию эпидермальных кератиноцитов, обработанных ИЛ-17A, а также на уровень экспрессии этими клетками важных для патогенеза псориаза генов.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Для проведения экспериментальной работы использовали культуры эпидермальных кератиноцитов человека, HaCaT-КТР и HaCaT-ММП1, полученные, как описано ранее (Могулевцева, Мезенцев, 2017). Клетки культивировали в среде ДЕМ, которая содержала 5 % эмбриональной сыворотки теленка, L-глутамин («ПанЭко», Россия) и антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher Scientific, США). В процессе роста клеток питательную среду заменяли свежей через день. При покрытии клетками 70–75 % ростовой поверхности культуру пересеивали в соотношении 1 : 5. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

Получение суммарной РНК. Суммарную РНК выделяли при помощи реагента TRIZOL (Thermo Fisher Scientific), согласно ранее описанному протоколу (Chomczynski, Mackey, 1995). Качество препаратов РНК проверяли электрофоретически – в 1.5 % агарозном геле, в неденатурирующих условиях. Для измерения концентрации РНК использовали флуориметрический метод и набор реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), согласно инструкции, предоставленной фирмой-производителем.

ПЦР в режиме реального времени. Перед проведением эксперимента из образцов выделенной РНК получали кДНК при помощи набора реагентов MMLV RT («Евроген», Россия). ПЦР в режиме реального времени проводили с праймерами из базы данных NCBI Probe (NCBI Probe, 2015) на приборе Eco (Illumina, США), согласно инструкции, предоставленной фирмой-производителем. В качестве эндогенного контроля использовали данные об экспрессии гена *ACTB*. Результаты анализировали при помощи компьютерной программы Eco (Illumina). Для каждого измерения готовили три параллельные пробы. Помимо этого каждый эксперимент повторяли трижды.

Количественная оценка пролиферации клеток. В 6-луночные планшеты высевали по 40 тыс. клеток на лунку. Ежедневно случайно выбранные образцы обрабатывали 0.25 % раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко»). После этого суспензию клеток окрашивали красителем, трипановым синим (0.2 %). Затем проводили подсчет клеток в камере Горяева и по данным о количестве клеток в образцах строили графики кривых роста в линейных координатах. О скорости пролиферации клеток судили по величине угла наклона полученной экспериментальной кривой

после представления данных в полулогарифмических координатах. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Количественная оценка миграции клеток. Клетки культивировали до тех пор, пока они полностью не покрывали поверхность культуральной чашки. Перед началом эксперимента по поверхности чашки при помощи носика для автоматической пипетки проводили прямую линию, очищая от клеток полосу шириной ~1.25 мм. Полученные образцы культивировали в течение пяти–шести дней, ежедневно фотографируя репрезентативные участки пока не занятых клетками областей. Для измерения площади ростовой поверхности, пока не занятой клетками, использовали сервисную опцию Free hand selection компьютерной программы ImageJ (Schindelin et al., 2015).

Статистическая обработка результатов. Результаты измерений представляли в виде: среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($m \pm SE$). Сравнение средних значений двух и более групп проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа. Если вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы не превышала 0.05, то статистические различия между средними величинами считали статистически значимыми.

Результаты

Влияние РНК-интерференции *MMP1* на экспрессию генов

Инкубация клеток HaCaT-KTP и HaCaT-MMP1 в присутствии ИЛ-17А приводит к разнонаправленным изменениям в экспрессии генов матриксных металлопротеиназ, цитокератинов, маркеров пролиферации и дифференцировки эпидермальных кератиноцитов (рис. 1).

Так, в клетках HaCaT-KTP существенно возрастает уровень экспрессии *MMP9* и *MMP12* (11.15 ± 1.67 и 7.58 ± 1.14 соответственно), а также снижается уровень экспрессии *MMP2* (0.37 ± 0.05). Аналогичные значения в клетках HaCaT-MMP1 составляют 2.29 ± 0.34 , 2.44 ± 0.37 и 0.98 ± 0.15 соответственно (см. рис. 1, а). При этом в клетках с «нокадауном» *MMP1* сохраняется низкий уровень экспрессии целевого гена (0.28 ± 0.04), несмотря на присутствие в культуральной среде высокой концентрации ИЛ-17А.

Экспрессия маркера пролиферации *MKI67* увеличивается в обеих линиях клеток (3.80 ± 0.57 в HaCaT-KTP и 5.66 ± 0.85 в HaCaT-MMP1, $p = 0.36$). Напротив, экспрессия циклинов *CCNA2* и *CCND1* снижается (см. рис. 1, б). Так, после обработки ИЛ-17А экспрессия *CCNA2* составляла 0.32 ± 0.05 в HaCaT-KTP и 0.13 ± 0.02 в HaCaT-MMP1, а экспрессия *CCND1* – 0.13 ± 0.02 и 0.71 ± 0.11 соответственно.

Обращает на себя внимание, что в клетках HaCaT-KTP наблюдаются незначительные изменения в экспрессии маркеров дифференцировки эпидермальных кератиноцитов и цитокератинов. Так, экспрессия *IVL* составляет 1.44 ± 0.13 , *LOR* – 1.15 ± 0.11 и *FLG* – 1.26 ± 0.27 (см. рис. 1, в). При этом значения упомянутых параметров в клетках HaCaT-MMP1 равны 1.01 ± 0.11 , 1.79 ± 0.17 и 0.89 ± 0.14 соответственно. Изменения в экспрессии цитокератинов, наблюдаемые в HaCaT-KTP (см. рис. 1, г), в большинстве случаев не превышают 1.5 раза по сравнению с контрольными образцами, за исключением *KRT14* и *KRT17* (1.86 ± 0.14 и 1.64 ± 1.15 соответственно). В клетках HaCaT-MMP1 экспрессия *KRT17*, напротив, значительно снижена (0.19 ± 0.02) по отношению к HaCaT-KTP.

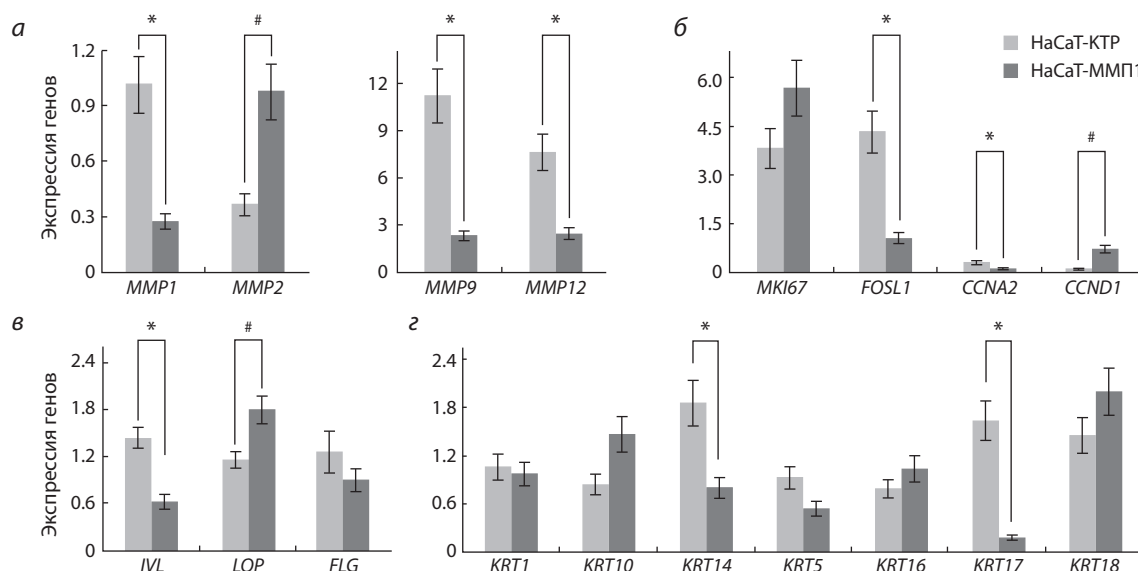


Рис. 1. Оценка изменений генной экспрессии в эпидермальных кератиноцитах человека HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTP, обработанных ИЛ-17А, методом количественной ПЦР. Представлены данные об экспрессии генов матриксных металлопротеиназ (а), маркеров пролиферации (б), маркеров терминальной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов (в) и цитокератинов (г).

Данные измерений нормировали по уровню экспрессии гена *ACTB*. Изменения генной экспрессии в HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTP, обработанных ИЛ-17А (50 нг/мл), приведены относительно контроля (клетки HaCaT-KTP без обработки ИЛ-17А). Статистически достоверные увеличения и уменьшения генной экспрессии в клетках HaCaT-MMP1 над HaCaT-KTP ($p < 0.05$, $n = 3$) обозначены знаками # и * соответственно.

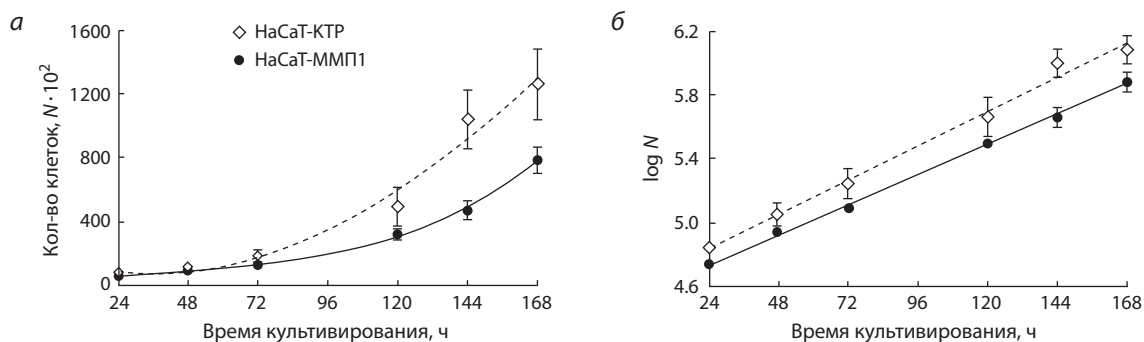


Рис. 2. Кривые роста эпидермальных кератиноцитов человека HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTR после их обработки ИЛ-17А: а – в линейных координатах; б – в полулогарифмических.

Клетки обрабатывали ИЛ-17А (50 нг/мл) в течение указанного периода времени.

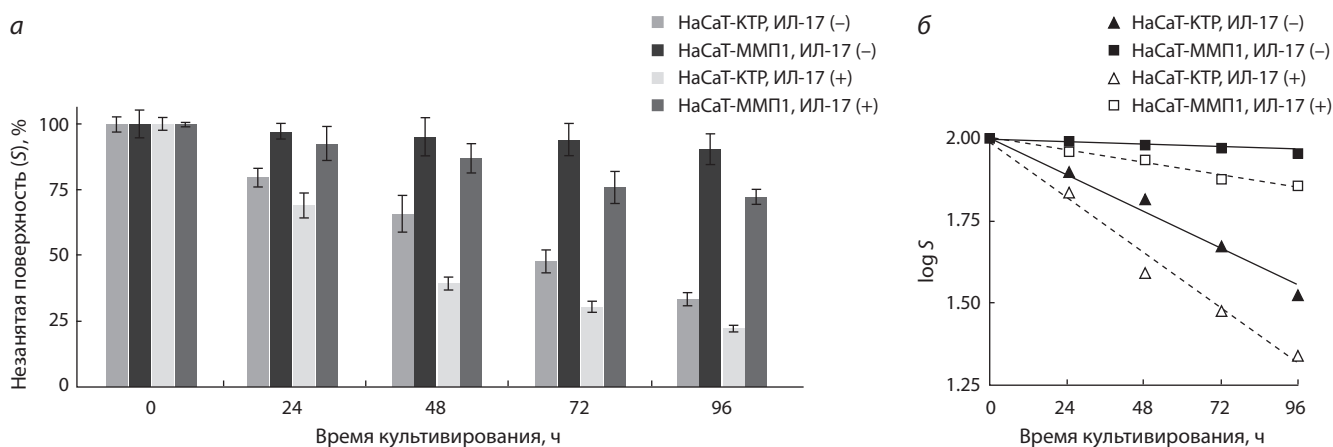


Рис. 3. Анализ изменений скорости миграции эпидермальных кератиноцитов человека HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTR, обработанных ИЛ-17А: а – в линейных координатах; б – в полулогарифмических.

Клетки обрабатывали ИЛ-17А (50 нг/мл) в течение указанного периода времени.

Влияние РНК-интерференции *MMP1* на скорость пролиферации клеток

При проведении анализа кривых роста было установлено, что в течение эксперимента исследуемые культуры клеток HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTR оставались в фазе экспоненциального роста (рис. 2). При представлении полученных данных в линейных координатах (см. рис. 2, а) изменения количества клеток во времени имели вид монотонно возрастающих кривых. В то же время линеаризация данных в полулогарифмических координатах (см. рис. 2, б) выявила высокую корреляцию между количеством клеток в культуре и продолжительностью их роста ($r > 0.99$, $p < 0.001$). Сопоставление кривых роста кератиноцитов с РНК-интерференцией *MMP1* и без нее показало, что снижение уровня экспрессии целевого гена привело к замедлению роста клеток (см. рис. 2, а). При этом количественная оценка констант скорости пролиферации по результатам регрессионного анализа составила 0.0078 ± 0.0003 в HaCaT-MMP1 и 0.0090 ± 0.0003 в HaCaT-KTR.

Влияние РНК-интерференции *MMP1* на скорость миграции

Анализ скоростей миграции клеток HaCaT-MMP1 и HaCaT-KTR показал, что РНК-интерференция *MMP1* при-

водит к существенному снижению подвижности эпидермальных кератиноцитов (рис. 3, а). Добавление в культуральную среду ИЛ-17А, напротив, повышает подвижность клеток. Константа скорости миграции клеток вследствие РНК-интерференции *MMP1* изменилась в 11.48 раза, а при добавлении в питательную среду ИЛ-17А – в 1.43 и 3.63 раза для клеток HaCaT-KTR и HaCaT-MMP1 соответственно (см. рис. 3, б).

Обсуждение

Цитокин ИЛ-17А относится к числу так называемых провоспалительных цитокинов. Эта группа биологически активных веществ играет ключевую роль в патогенезе ряда аутоиммунных заболеваний, в том числе псориаза (Коротаяева, 2016). Иммунные клетки (клетки-хелперы T_{H17}), которые находятся в пораженной псориазом коже, секретируют ИЛ-17А в межклеточный матрикс. После секреции ИЛ-17А активирует рецептор IL-17RA, который расположен на поверхности резидентных клеток кожи (кератиноцитов, дендритных клеток и фибробластов) и клеток иммунной системы (например, макрофагов). Активация рецептора приводит к увеличению биосинтеза других провоспалительных факторов: цитокинов (ФНО, ИЛ-1 β , ИЛ-6 и др.) и хемокинов (ИЛ-8, CXCL1, CXCL2 и CCL20)

(Mills, 2008; Seo et al., 2017). Цитокины воздействуют на пролиферацию и дифференцировку эпидермальных кератиноцитов, что приводит к образованию псориазических бляшек. Хемокины стимулируют миграцию иммунных клеток (главным образом нейтрофилов и моноцитов) в пораженный болезнью участок кожи. При этом инфильтрация кожи иммунными клетками способствует стабилизации воспалительного процесса.

При работе с культурами эпидермальных кератиноцитов мы использовали ИЛ-17А в концентрации 50 нг/мл (Соболев и др., 2010), что выше концентрации этого цитокина в сыворотке крови здорового человека – 10 пг/мл (Шилова и др., 2015). Однако в лабораторной практике для воспроизведения физиологических эффектов ИЛ-17А, таких как активация киназ (Peric et al., 2008, 2009), индукция генов провоспалительных цитокинов (Tohyama et al., 2009; Cho et al., 2012) или изменение скорости пролиферации (Ma et al., 2016) в культивируемых клетках кожи, прежде всего фибробластах и кератиноцитах, как правило, используют ИЛ-17А в концентрации от 10 до 100 нг/мл. По-видимому, это объясняется тем, что ко времени появления псориазических бляшек иммунные клетки T_{H17} – главные продуценты ИЛ-17А – уже находятся в очаге воспаления, где, собственно, и происходит преимущественное накопление ИЛ-17А в количестве, необходимом для стабилизации воспалительного процесса.

Обработывая ИЛ-17А клетки HaCaT-KTP и HaCaT-MMP1, мы в первую очередь полагали увидеть нарушения в экспрессии генов, связанные с дифференцировкой и пролиферацией эпидермальных кератиноцитов, которые обычно сопровождают образование псориазических бляшек. Соответственно, наблюдаемые в экспериментах изменения в экспрессии *IVL*, *MKI67* и ряда цитокератинов (*KRT14* и *KRT17*) в клетках HaCaT-KTP (линия, которая экспрессировала контрольную shРНК) не стали для нас неожиданностью (см. рис. 1). Помимо этого нас также интересовало, каким образом РНК-интерференция *MMP1* могла бы повлиять на экспрессию важных для патогенеза псориаза генов. Дело в том, что многие из наблюдаемых нами изменений, например увеличение экспрессии *MKI67*, *MMP9* и *MMP12* и уменьшение экспрессии *CCNA2* и *CCND1*, происходили как в HaCaT-KTP, так и в HaCaT-MMP1, т.е. не были вызваны РНК-интерференцией *MMP1* (см. рис. 1, а, б). В то же время ряд показателей, полученных для клеток HaCaT-MMP1 (более низкий уровень *MMP9* и *MMP12*, а также более высокий уровень экспрессии *MMP2*), свидетельствуют о том, что экспрессия shРНК, специфичной к *MMP1*, могла бы частично компенсировать изменения в профиле экспрессии генов матриксных металлопротеиназ, происходящие в пораженной болезнью коже (Nair et al., 2009). Изменения в экспрессии маркеров дифференцировки, такие как упомянутые выше снижение экспрессии *IVL* ($p = 0.05$) и увеличение экспрессии *LOR* ($p = 0.03$) в клетках HaCaT-MMP1 (см. рис. 1, в), также противоположны тем, что происходят в пораженной псориазом коже. При этом мы не обнаружили статистически достоверных различий в экспрессии *FLG* в HaCaT-MMP1 по сравнению с HaCaT-KTP ($p = 0.29$).

Примечательно, что обработка обеих клеточных линий ИЛ-17А не приводит к существенным изменениям в

экспрессии большинства исследованных цитокератинов (см. рис. 1, з). Отсутствие таких изменений, по данным литературы (Noh et al., 2010; Seo et al., 2012), отличает HaCaT (клеточную линию, из которой были получены клетки HaCaT-KTP и HaCaT-MMP1) от первичных эпидермальных кератиноцитов. Так, обработка первичных кератиноцитов человека ИЛ-17А (50 нг/мл) приводит к снижению экспрессии *KRT10*, *FLG*, *LOR* и *IVL* (Noh et al., 2010), тогда как в культуре клеток HaCaT значительных изменений в экспрессии вышеупомянутых генов не происходит (Seo et al., 2012). С другой стороны, согласно полученным нами данным, в клетках HaCaT-KTP наблюдается увеличение экспрессии *KRT14* и *KRT17*, которое аналогично тому, что происходит в пораженной болезнью коже (Nair et al., 2009). Примечательно здесь, что РНК-интерференция *MMP1* приводит к снижению экспрессии обоих генов. Причем наиболее показательным является почти десятикратное снижение экспрессии гена *KRT17*. В ранее опубликованных работах *KRT17* рассматривают в качестве одного из «ключевых» для патогенеза псориаза генов (Al Robaee, 2010; Jin, Wang, 2014). У лабораторных животных подавление экспрессии *KRT17* препятствует развитию гиперплазии (увеличению массы ткани за счет увеличения частоты деления клеток) и снижает интенсивность воспалительного процесса. Повышенная экспрессия *KRT17*, напротив, приводит к увеличению секреции T_{H1} хемокинов CXCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11 (Al Robaee, 2010). В силу этого мы полагаем, что РНК-интерференция *MMP1* могла бы быть востребована для ослабления воспалительного процесса и подавления гиперплазии в пораженной болезнью коже.

Сравнение профилей геной экспрессии клеток, обработанных ИЛ-17А, также выявило более низкий уровень экспрессии *CCNA2* и более высокий – *CCND1* в клетках HaCaT-MMP1, по сравнению с клетками HaCaT-KTP (см. рис. 1, б). При этом между упомянутыми линиями клеток отсутствуют статистически достоверные изменения уровня экспрессии маркера пролиферации *MKI67* ($p = 0.36$). Как показано ранее, экспрессия *CCND1* необходима для перехода клетки из G_1 в S-фазу клеточного цикла, а экспрессия *CCNA2* – для перехода из G_2 непосредственно к митозу (М) (Matsushima et al., 1992; Pagano et al., 1992). Интересно, что при псориазе изменения в экспрессии циклинов происходят в противоположном направлении. Так, в образцах, полученных из пораженной болезнью кожи, если их сравнивать с визуально нормальной кожей больных, экспрессия *CCND1* уменьшается примерно в 2 раза (Reischl et al., 2007), а экспрессия *CCNA2* возрастает в 8.7 раза (Manczinger, Kemény, 2013). Кроме того, наблюдаемые нами изменения баланса циклинов согласуются с результатами исследований пролиферации клеток. Культивирование клеток HaCaT-MMP1 в присутствии ИЛ-17А приводит к снижению константы пролиферации этих клеток, по сравнению с HaCaT-KTP, в ~1.15 раза (см. рис. 2). В соответствии с этим мы предполагаем, что при использовании *in vivo* РНК-интерференции *MMP1* могла бы обладать антипролиферативным эффектом в условиях накопления ИЛ-17А в пораженной болезнью коже. Последнее обстоятельство представляется нам немаловажным, если учесть, что сам ИЛ-17А не оказывает

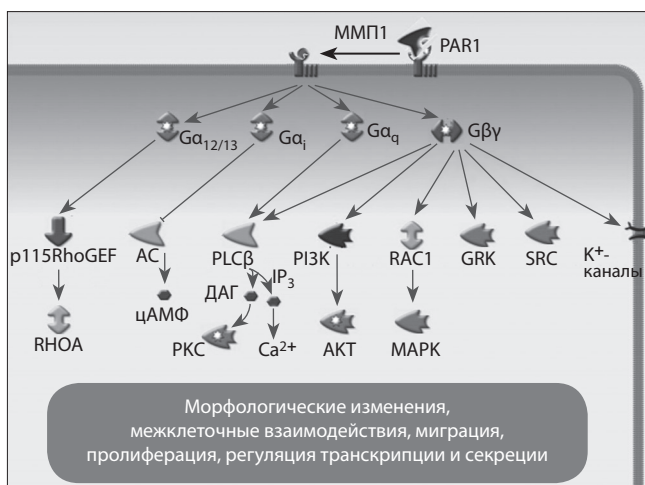


Рис. 4. Участие MMP1 в регуляции внутриклеточных сигнальных механизмов путем активации рецептора PAR1.

Белки, участвующие в активируемых G-белками сигнальных механизмах: p115RhoGEF – первый Rho-фактор обмена гуанидин-нуклеотида; AC – аденилатциклаза; PLCβ – изоформа β фосфолипазы C; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; RAC1 – RAC-ассоциированный субстрат ботулотоксина C3; GRK – рецепторная киназа G-белков; SRC – гомолог киназы вируса саркомы Рауса; RHOA – гомологичный белок A семейства RAS; PKC – протеинкиназа C; AKT – киназа AKT или протеинкиназа B; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы. Продукты катализируемых ими реакций: DAG – диацилглицерин; IP₃ – инозитолтрифосфат; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат.

существенного стимулирующего действия на пролиферацию эпидермальных кератиноцитов (Соболева и др., 2014).

Помимо этого инкубация клеток HaCaT-KTP с ИЛ-17А приводит к изменениям экспрессии генов матриксных металлопротеиназ (см. рис. 1, а): *MMP2* (0.37 ± 0.05), *MMP9* (11.15 ± 1.67) и *MMP12* (7.58 ± 1.14). Примечательно, что при псориазе в экспрессии матриксных металлопротеиназ происходят аналогичные изменения. Так, данные, полученные ранее в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что в пораженной псориазом коже, по сравнению с визуально нормальной кожей больного, экспрессия *MMP2* снижается (0.77 ± 0.23), а экспрессия *MMP9* и *MMP12* возрастает в 4.2 ± 0.65 и 17.25 ± 5.80 раза соответственно (Стародубцева и др., 2011). В то же время в клетках HaCaT-MMP1, т. е. в условиях РНК-интерференции MMP1, уровень экспрессии упомянутых генов (0.98 ± 0.15 , 2.29 ± 0.34 и 2.44 ± 0.37 соответственно) сопоставим с контрольными образцами (клетками HaCaT-KTP, не обработанными ИЛ-17А). Таким образом, полученные нами результаты говорят о возможности использования РНК-интерференции для того, чтобы контролировать экспрессию упомянутых выше генов матриксных металлопротеиназ, в первую очередь *MMP9* и *MMP12*.

Наконец, нами показано, что ИЛ-17А увеличивает подвижность как клеток HaCaT-MMP1, так и HaCaT-KTP (см. рис. 3). Согласно данным литературы, ИЛ-17А обладает способностью ускорять миграцию фибробластов (Wu et al., 2014) и клеток сосудистого эндотелия (Vegfors et al., 2016). При этом влияние ИЛ-17А на миграцию эпидермальных кератиноцитов до настоящего времени опи-

сано не было. Как уже отмечалось, подвижность данного типа клеток напрямую зависит от уровня экспрессии ряда матриксных металлопротеиназ – *MMP1*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP13* и др. (Mezentsev et al., 2014). Кроме того, подвижность эпидермальных кератиноцитов увеличивается в присутствии фактора некроза опухоли (ФНО), благодаря способности этого цитокина индуцировать *MMP9* (Scott et al., 2004). В цитируемом нами исследовании отмечается, что скорость миграции тем выше, чем больше в питательной среде концентрация ФНО. Напротив, обработка клеток антителами, которые специфичны либо к MMP9, либо к ФНО, существенным образом замедляет их миграцию. Аналогичным образом в наших экспериментах показано, что присутствие ИЛ-17А в культуральной среде сопровождается увеличением экспрессии *MMP9* и *MMP12*. Клетки HaCaT-KTP, обработанные ИЛ-17А, где уровень экспрессии матриксных металлопротеиназ повышен, также обладают более высокой подвижностью. В то же время у клеток HaCaT-MMP1, обработанных ИЛ-17А, подвижность, как и экспрессия *MMP*, заметно снижаются (см. рис. 1, а).

В заключение мы хотели бы добавить, что полученные нами результаты интересны тем, что позволяют по-новому взглянуть на традиционную роль MMP1 как протеолитического фермента. Очевидно, что влияние РНК-интерференции *MMP1* на экспрессию генов циклинов и цитокератинов, а также наблюдаемый антипролиферативный эффект можно объяснить непосредственным участием этого фермента во внутриклеточных сигнальных механизмах. Прежде всего, это возможно благодаря тому, что при протеолитическом расщеплении ряда белков межклеточного матрикса образуются биологически активные вещества (матрикины). Эти вещества могут выполнять функцию медиаторов сигнальных процессов (Wells et al., 2015). Кроме того, некоторые матриксные металлопротеиназы, включая MMP1, обладают способностью активировать рецепторы семейства PAR (Boire et al., 2005). Так, активация сопряженного с G-белками рецептора PAR1 (рис. 4) происходит в результате протеолитического расщепления N-концевой части его молекулы. Образующийся N-концевой пептид выполняет функцию лиганда. Он взаимодействует с рецептором, в результате чего образуется рецептор-лигандный комплекс. В свою очередь рецептор-лигандный комплекс взаимодействует с G-белками ($G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ и $G\beta\gamma$). Эти белки активируют подконтрольные им внутриклеточные сигнальные механизмы, что, в зависимости от конкретных условий, приводит к тому или иному физиологическому эффекту. К числу таких эффектов относятся: изменения формы и поведения клеток, транскрипция генов и секреция ими белков. Факторы, определяющие взаимодействие рецептора конкретными G-белками, в настоящее время являются предметом интенсивных исследований. Немаловажно, что все вышеперечисленное имеет непосредственное отношение к гиперплазии и гиперпролиферации, которые можно наблюдать в патогенезе псориаза. Наконец, полученные нами результаты могут быть использованы в генной терапии псориаза. В этой связи мы хотели бы добавить, что ранее уже была показана принципиальная возможность использования лентивирусной трансдукции

для достижения ремиссии псориаза у гуманизированных животных (Jakobsen et al., 2009). Помимо этого, в течение многих лет ведутся работы по созданию искусственных вирусов, которые специально предназначены для доставки генетического материала в пораженные болезнью органы и ткани, а некоторые из этих разработок уже успешно применяются для лечения наследственных заболеваний человека (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Bainbridge et al., 2008).

Благодарности

Авторы признательны проф. Э.С. Пирузян за критический анализ рукописи и участие в обсуждении полученных результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Батыршина С.В., Садыкова Ф.Г. Коморбидные состояния у больных псориазом. *Практ. медицина*. 2014;8:32-35. [Batyrsina S.V., Sadykova F.G. Comorbid conditions in patients with psoriasis. *Prakticheskaya Meditsina = Practical Medicine*. 2014;8:32-35. (in Russian)]
- Коротаева Т.В. Перспективы применения ингибиторов интерлейкина 17 – нового класса препаратов для таргетной терапии псориатического артрита. *Науч.-практ. ревматология*. 2016;54(3):346-351. DOI 10.14412/1995-4484-2016-346-351. [Korotaeva T.V. Prospects for using interleukin-17 inhibitors, a new class of drugs for targeted therapy of psoriatic arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2016;54(3):346-351. DOI 10.14412/1995-4484-2016-346-351. (in Russian)]
- Мишина О.С., Дворников А.С., Донцова Е.В. Анализ заболеваемости псориазом и псориатическим артритом в Российской Федерации за 2009–2011 гг. *Доктор.ру*. 2013;4:52-55. [Mishina O.S., Dvornikov A.S., Dontsova E.V. Psoriasis and psoriatic arthritis: Analysis of 2009–2011 incidence rates in the Russian Federation. *Doctor.ru*. 2013;4:52-55. (in Russian)]
- Могулевцева Ю.А., Мезенцев А.В. Оптимизация условий лентивиральной трансдукции иммортализованных эпидермальных кератиноцитов. Развитие современной науки: теоретические и прикладные аспекты. 2017;13:123-134. [Mogulevtseva J.A., Mezentsev A.V. Optimization of lentiviral transduction of immortalized epidermal keratinocytes. *Modern Science: Theory and Practice*. 2017;13:123-134. (in Russian)]
- Руквишников В.М. Изменения ногтей при псориазе. *Вестн. дерматологии и венерологии*. 2009;2:71-79. [Rukavishnikova V.M. Change of nails at psoriasis. *Vestnik Dermatologii i Venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*. 2009;2:71-79. (in Russian)]
- Соболев В.В., Стародубцева Н.Л., Соболева А.Г., Рахимова О.Ю., Корсунская И.М., Пирузян Э.С., Миннибаев М.Т., Кривошапов Л., Брускин С.А., Воронько О.Е. Роль интерлейкинов в патогенезе псориаза. *Соврем. пробл. дерматовенерологии, иммунологии и врач. косметологии*. 2010;5(5):79-84. [Sobolev V.V., Starodubtseva N.L., Soboleva A.G., Rakhimova O.Yu., Korsunskaya I.M., Piruzian E.S., Minnibaev M.T., Krivoschapov L., Bruskin S.A., Voronko O.E. Role of interleukins in psoriasis. *Sovremennye Problemy Dermatovenerologii, Immunologii i Vrachebnoy Kosmetologii = Current Problems of Dermatovenereology, Immunology, and Medical Cosmetology*. 2010;5(5):79-84. (in Russian)]
- Соболева А.Г., Золотаренко А.Д., Соболев В.В., Брускин С.А., Пирузян Э.С., Мезенцев А.В. Генетически обусловленное ограничение использования клеток HaCaT в качестве модельной системы псориаза. *Генетика*. 2014;50(10):1222-1231. DOI 10.7868/S0016675814100130. [Soboleva A.G., Zolotareno A.D., Sobolev V.V., Bruskin S.A., Piruzian E.S., Mezentsev A.V. Genetically predetermined limitation in HaCaT cells that affects their ability to serve as an experimental model of psoriasis. *Russ. J. Genetics (Moscow)*. 2014;50(10):1081-1089. DOI 10.1134/S1022795414100123.]
- Стародубцева Н.Л., Соболев В.В., Соболева А.Г., Николаев А.А., Брускин С.А. Экспрессия генов металлопротеаз (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-12*) при псориазе. *Генетика*. 2011;47(9):1254-1261. [Starodubtseva N.L., Sobolev V.V., Soboleva A.G., Nikolaev A.A., Bruskin S.A. Genes expression of metalloproteinases (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9*, and *MMP-12*) associated with psoriasis. *Russ. J. Genetics (Moscow)*. 2011;47(9):1117-1123. DOI 10.1134/S102279541109016X.]
- Хамаганова И.В., Алмазова А.А., Лебедева Г.А., Ермаченко А.В. Проблемы эпидемиологии псориаза. *Клин. дерматология и венерология*. 2015;1:12-16. DOI 10.17116/klinderma2015112-16. [Khamaganova I.V., Almazova A.A., Lebedeva G.A., Ermachenko A.V. Psoriasis epidemiology issues. *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya = Russian Journal of Dermatology and Venereology*. 2015;1:12-16. DOI 10.17116/klinderma2015112-16. (in Russian)]
- Шилова Л.Н., Паньшина Н.Н., Чернов А.С., Трубенко Ю.А., Хортиева С.С., Морозова Т.А., Паншин Н.Г. Иммунопатологическое значение интерлейкина-17 при псориатическом артрите. *Соврем. пробл. науки и образования*. 2015;6:54. [Shilova L.N., Pan'shina N.N., Chernov A.S., Trubenko Y.A., Khortieva S.S., Morozova T.A., Pan'shin N.G. Immunopathological significance of interleukin-17 in psoriatic arthritis. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya = Current Problems of Science and Education*. 2015;6:54. (in Russian)]
- Al Robaee A.A. Molecular genetics of Psoriasis (Principles, technology, gene location, genetic polymorphism and gene expression). *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. 2010;4(2):103-127.
- Bainbridge J.W., Smith A.J., Barker S.S., Robbie S., Henderson R., Balaggan K., Viswanathan A., Holder G.E., Stockman A., Tyler N., Petersen-Jones S., Bhattacharya S.S., Thrasher A.J., Fitzke F.W., Carter B.J., Rubin G.S., Moore A.T., Ali R.R. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med*. 2008;358(21):2231-2239. DOI 10.1056/NEJMoa0802268.
- Boire A., Covic L., Agarwal A., Jacques S., Sherif S., Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*. 2005;120(3):303-313. DOI 10.1016/j.cell.2004.12.018.
- Canavan T.N., Elmets C.A., Cantrell W.L., Evans J.M., Elewski B.E. Anti-IL-17 medications used in the treatment of plaque psoriasis and psoriatic arthritis: a comprehensive review. *Am. J. Clin. Dermatol*. 2016;17(1):33-47. DOI 10.1007/s40257-015-0162-4.
- Cho K.A., Suh J.W., Lee K.H., Kang J.L., Woo S.Y. IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1 β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Int. Immunol*. 2012;24(3):147-158. DOI 10.1093/intimm/dxr110.
- Chomczynski P., Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide and proteoglycan-rich sources. *BioTechniques*. 1995;19(6):942-945.
- Goldminz A.M., Elder J.T., Lebwohl M.G., Gladman D.D., Wu J.J., Mehta N.N., Finlay A.Y., Gottlieb A.B. Psoriasis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2016;2:16082. DOI 10.1038/nrdp.2016.82.
- Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F., Bouneaud C., Hue C., De Villartay J.P., Thrasher A.J., Wulffraat N., Sorensen R., Dupuis-Girod S., Fischer A., Davies E.G., Kuis W., Leiva L., Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med*. 2002;346(16):1185-1193. DOI 10.1056/NEJMoa012616.
- Jakobsen M., Stenderup K., Rosada C., Moldt B., Kamp S., Dam T.N., Jensen T.G., Mikkelsen J.G. Amelioration of psoriasis by anti-TNF- α RNAi in the xenograft transplantation model. *Mol. Ther*. 2009;17(10):1743-1753. DOI 10.1038/mt.2009.141.
- Jin L., Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med. Res. Rev*. 2014;34(2):438-454. DOI 10.1002/med.21291.

- Ma W.Y., Jia K., Zhang Y. IL-17 promotes keratinocyte proliferation via the downregulation of C/EBP α . *Exp. Ther. Med.* 2016;11(2):631-636. DOI 10.3892/etm.2015.2939.
- Manczinger M., Kemény L. Novel factors in the pathogenesis of psoriasis and potential drug candidates are found with systems biology approach. *PLoS One.* 2013;8(11):e80751. DOI 10.1371/journal.pone.0080751.
- Matsushime H., Ewen M.E., Strom D.K., Kato J.Y., Hanks S.K., Rousel M.F., Sherr C.J. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell.* 1992;71(2):323-334.
- Mezentsev A., Nikolaev A., Bruskin S. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene.* 2014;540(1):1-10. DOI 10.1016/j.gene.2014.01.068.
- Michalek I.M., Loring B., John S.M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 2017;31(2):205-212. DOI 10.1111/jdv.13854.
- Mills K.H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 2008;38(10):2636-2649. DOI 10.1002/eji.200838535.
- Nair R.P., Duffin K.C., Helms C., Ding J., Stuart P.E., Goldgar D., Gudjonsson J.E., Li Y., Tejasvi T., Feng B.J., Ruether A., Schreiber S., Weichenthal M., Gladman D., Rahman P., Schrodin S.J., Prahalad S., Guthery S.L., Fischer J., Liao W., Kwok P.Y., Menter A., Lathrop G.M., Wise C.A., Begovich A.B., Voorhees J.J., Elder J.T., Krueger G.G., Bowcock A.M., Abecasis G.R., for the Collaborative Association Study of Psoriasis. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- κ B pathways. *Nat. Genet.* 2009;41(2):199-204. DOI 10.1038/ng.311.
- NCBI Probe. 2015. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>
- Noh M., Yeo H., Ko J., Kim H.K., Lee C.H. MAP17 is associated with the T-helper cell cytokine-induced down-regulation of filaggrin transcription in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2010;19(4):355-362. DOI 10.1111/j.1600-0625.2009.00902.x.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992;11(3):961-971.
- Peric M., Koglin S., Dombrowski Y., Gross K., Bradac E., Büchau A., Steinmeyer A., Zügel U., Ruzicka T., Schaubert J. Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis. *PLoS One.* 2009;4(7):e6340. DOI 10.1371/journal.pone.0006340.
- Peric M., Koglin S., Kim S.M., Morizane S., Besch R., Prinz J.C., Ruzicka T., Gallo R.L., Schaubert J. IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes. *J. Immunol.* 2008;181(12):8504-8512.
- Rao K.S., Babu K.K., Gupta P.D. Keratins and skin disorders. *Cell. Biol. Int.* 1996;20(4):261-274.
- Reischl J., Schwenke S., Beekman J.M., Mrowietz U., Stürzebecher S., Heubach J.F. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127(1):163-169. DOI 10.1038/sj.jid.5700488.
- Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 2015;82(7-8):518-529. DOI 10.1002/mrd.22489.
- Scott K.A., Arnott C.H., Robinson S.C., Moore R.J., Thompson R.G., Marshall J.F., Balkwill F.R. TNF- α regulates epithelial expression of MMP-9 and integrin α v β 6 during tumour promotion. A role for TNF- α in keratinocyte migration? *Oncogene.* 2004;23(41):6954-6966. DOI 10.1038/sj.onc.1207915.
- Seo K.Y., Kitamura K., Han S.J., Kelsall B. Th17 cells mediate inflammation in a novel model of spontaneous experimental autoimmune lacrimal keratoconjunctivitis with neural damage. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; pii: S0091-6749(17)31504-X. DOI 10.1016/j.jaci.2017.07.052.
- Seo M.D., Kang T.J., Lee C.H., Lee A.Y., Noh M. HaCaT keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. *Biomol. Ther. (Seoul).* 2012;20(2):171-176. DOI 10.4062/biomolther.2012.20.2.171.
- Soboleva A.G., Mezentsev A., Zolotorenko A., Bruskin S., Piruzian E. Three-dimensional skin models of psoriasis. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(5-6):301-310. DOI 10.1159/000369925.
- Tohyama M., Hanakawa Y., Shirakata Y., Dai X., Yang L., Hirakawa S., Tokumaru S., Okazaki H., Sayama K., Hashimoto K. IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur. J. Immunol.* 2009;39(10):2779-2788. DOI 10.1002/eji.200939473.
- Vegfors J., Ekman A.K., Stoll S.W., Bivik Eding C., Enerbäck C. Psoriasis (S100A7) promotes stress-induced angiogenesis. *Br. J. Dermatol.* 2016;175(6):1263-1273. DOI 10.1111/bjd.14718.
- Wells J.M., Gaggari A., Blalock J.E. MMP generated matrikines. *Matrix Biol.* 2015;44-46:122-129. DOI 10.1016/j.matbio.2015.01.016.
- Wu Y., Zhu L., Liu L., Zhang J., Peng B. Interleukin-17A stimulates migration of periodontal ligament fibroblasts via p38 MAPK/NF- κ B-dependent MMP-1 expression. *J. Cell. Physiol.* 2014;229(3):292-299. DOI 10.1002/jcp.24444.
- Yazici A.C., Tursen U., Apa D.D., Ikizoglu G., Api H., Baz K., Tasdelen B. The changes in expression of ICAM-3, Ki-67, PCNA, and CD31 in psoriatic lesions before and after methotrexate treatment. *Arch. Dermatol. Res.* 2005;297(6):249-255. DOI 10.1007/s00403-005-0602-8.
- Zolotorenko A., Chekalin E., Mesentsev A., Kiseleva L., Gribanova E., Mehta R., Baranova A., Tatarinova T.V., Piruzian E.S., Bruskin S. Integrated computational approach to the analysis of RNA-seq data reveals new transcriptional regulators of psoriasis. *Exp. Mol. Med.* 2016;48(11):e268. DOI 10.1038/emmm.2016.97.



Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы

Г.С. Батурина¹, И.Г. Пальчикова², А.А. Конев², Е.С. Смирнов², Л.Е. Каткова¹, Е.И. Соленов^{1, 3, 4}, И.А. Исаков⁵

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

² Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

⁵ Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

Транспорт воды и ионов клетками эндотелия роговицы определяет ее жизнеспособность и оптические свойства. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы глаза на концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы. С этой целью определяли внутриклеточную концентрацию натрия в клетках эндотелия роговицы глаза свиньи после гипотермической консервации при 4 °C в течение 1 и 10 суток и трансплантатов роговицы человека после 10 суток консервации. Концентрацию внутриклеточного натрия определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen в препаратах клеток эндотелия. Анализ флуоресцентных изображений клеток проводили с применением оригинальной программы CytoDynamics. Расчет концентраций натрия в клетках эндотелия роговицы свиньи выявил значительное повышение уровня внутриклеточного натрия после гипотермической консервации. Показано статистически значимое снижение проницаемости для натрия плазматических мембран клеток эндотелия после консервации. Уровень внутриклеточного натрия в клетках эндотелия препаратов роговицы человека после гипотермической консервации был выше, чем в аналогичных образцах эндотелия роговицы свиньи. Концентрация внутриклеточного натрия – перспективный интегральный показатель функциональной компетентности клеток эндотелия исследуемого образца роговицы.

Ключевые слова: гипотермическая консервация; трансплантат роговицы глаза; внутриклеточный натрий; эндотелий роговицы глаза.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Батурина Г.С., Пальчикова И.Г., Конев А.А., Смирнов Е.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Исаков И.А. Исследование влияния гипотермической консервации на уровень натрия в клетках эндотелия трансплантата роговицы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):433-437. DOI 10.18699/VJ18.379

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Baturina G.S., Palchikova I.G., Konev A.A., Smirnov E.S., Katkova L.E., Solenov E.I., Isakov I.A. Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):433-437. DOI 10.18699/VJ18.379 (in Russian)

УДК 611.841.2:581.143.4

Поступила в редакцию 17.11.2017

Принята к публикации 12.02.2018

© АВТОРЫ, 2018

✉ e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Study of the effect of hypothermic conservation on the intracellular sodium concentration in the endothelium of corneal transplants

G.S. Baturina¹, I.G. Palchikova², A.A. Konev², E.S. Smirnov², L.E. Katkova¹, E.I. Solenov^{1, 3, 4}, I.A. Isakov⁵

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

⁵ S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russia

Endothelial keratoplasty has become the treatment of choice for corneal endothelial dysfunction. Advancements in the surgical treatment of corneal endothelial diseases depend on progress in graft conservation and its related advantages in assessing the suitability of grafts for transplantation. Transport of water and ions by cornea endothelium is important for the optic properties of cornea. In this work, we study the intracellular sodium concentration in cornea endothelial cells in samples of pig cornea that underwent hypothermic conservation for 1 and 10 days and endothelial cells of human cornea grafts after 10-day conservation. The concentration of intracellular sodium in preparations of endothelial cells was assayed using fluorescent dye SodiumGreen. The fluorescent images were analyzed with the custom-made computer program CytoDynamics. An increased level of intracellular sodium was shown in the endothelium after 10-day conservation in comparison with one-day conservation (pig samples). Sodium permeability of pig endothelial cell plasma membranes significantly decreased in these samples. Assessment of intracellular sodium in human cornea endothelium showed a higher level – as was in analogues pig samples of the corneal endothelium. The assay of the intracellular sodium balance concentration established in endothelial cells after hypothermic conservation in mediums L-15 and Optisol-GS showed a significant advantage of specialized medium Optisol-GS. The balanced intracellular concentration after 10 days of hypothermic conservation was significantly lower in cells incubated at 4 °C in Optisol-GS ($L-15, 128 \pm 14, n = 15$; Optisol-GS, $108 \pm 14, n = 11$; mM, $p < 0.001$). Intracellular sodium concentration could be a useful parameter for assessing cornea endothelium cell viability.

Key words: hypothermic conservation; corneal transplants; intracellular sodium; corneal endothelium.

Одна из проблем кератопластики – предупреждение отека трансплантата. Эффективность восстановления роговичного трансплантата зависит от интенсивности транспорта электролитов и воды через эндотелий роговицы, важной функцией которого является поддержание осмотического равновесия роговицы. Успешность сквозной кератопластики во многом зависит от функционального состояния эндотелия. Нарушение этого клеточного слоя ведет к болезни трансплантата. Эндотелий представляет собой клеточный монослой, целостность которого необходима для его функционирования как насоса, регулирующего осмотический баланс матрикса роговицы. Водно-электролитное равновесие матрикса роговицы определяется интенсивностью транспорта осмолитов и воды клетками роговичного эндотелия. Снижение транспорта воды и ионов этими клетками приводит к отеку роговицы и снижению ее прозрачности. Определение жизнеспособных эндотелиальных клеток с применением красителя трепановый синий с помощью теста на фрагментацию ДНК (TUNEL assay) не позволяет оценивать состояние собственно транспортных механизмов клеток эндотелия. В то же время не существует общепринятого метода прямой оценки транспортной функции эндотелия и направленного в переднюю камеру глаза потока воды и ионов (Bonanno, 2012; Schmedt et al., 2012). В молекулярный механизм этого транспорта на базальной, обращенной к матриксу роговицы, поверхности эндотелия входят: Na/K-АТФаза, электрогенный натрий-бикарбонат котранспортер ($1\text{Na}^+ : 2\text{HCO}_3^-$, *SLC4A4*, NBCe1), $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$ (NKCC), ионообменники: хлорид-бикарбонат ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, *SLC4A2*, AE2) и натрий-протонный (Na^+/H^+ , *SLC9A6*, NHE1) (Riley et al., 1995; Kuang et al., 2004). На апикальной поверхности идентифицированы хлоридные каналы CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) и CaCC (Calcium activated Chloride Channel (CLCA1)), которые, по-видимому, не вносят значительного вклада в общий транспорт и активируются только в стрессовых ситуациях (Bonanno, 2003). Каналы проницаемы и для бикарбонат иона как $4/1 \text{ Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. В эндотелиальных клетках роговицы отмечают высокую плотность митохондрий. Производимый ими АТФ служит не только субстратом для Na/K-АТФазы, но и сигнальным фактором, как и внутриклеточный кальций, через пуриnergические рецепторы способен повышать проводимость апикальной поверхности для HCO_3^- , активируя CaCC (Bonanno, 1999). В механизме трансэпителиального переноса ионов и воды основным источником энергии для векторного транспорта является Na/K-АТФаза. Наряду с другим электрогенным транспортером, NBCe1, Na/K-АТФаза создает градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране эндотелиальных клеток, что служит вторичным источником энергии для выполнения этими клетками функции «насоса». Таким образом, естественно рассматривать концентрацию внутриклеточного натрия как результат баланса активности натрий-калиевого насоса и потоков через каналы и ионообменники плазматической мембраны клетки.

В настоящей работе проведено исследование влияния гипотермической инкубации на равновесную концентрацию внутриклеточного натрия в клетках эндотелия

роговицы, устанавливающуюся в клетках после прекращения консервации, и зависимости этого параметра от среды, в которой ткань роговицы сохранялась в условиях гипотермии.

Материалы и методы

Культура клеток и микроскопия. Исследовали влияние гипотермической консервации роговицы свиньи и человека на способность эндотелиоцитов восстанавливать внутриклеточную концентрацию натрия ($[\text{Na}^+]_i$) после прекращения гипотермии. Фрагменты роговицы человека в виде трепанированных дисков получали в процессе выполнения сквозной кератопластики у пациентов с кератоконусом. Препараты роговицы свиньи помещали в чашки Петри, заполненные культуральной средой L-15 Leibovitz (Sigma, США). Препараты роговицы человека инкубировали в среде L-15 и Optisol-GS. Препараты роговицы свиньи – в течение 1 и 10 суток, человека – 10 суток инкубировали при 4 °C. Переживающую культуру клеток эндотелия роговицы получали переносом клеток на покровное стекло. С этой целью фрагмент роговицы инкубировали в растворе коллагеназы (1 мг/мл Collagenase, Sigma (США) в PBS при 37 °C, 30 мин), затем делали отпечаток эндотелия на покровное стекло, покрытое полилизинном (Poly-L-lysine solution 0.1 % (w/v) H_2O , Sigma, США). Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращенных базальной стороной в сторону омывающего раствора. Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив Fluor 20×/0.75 M27, Zeiss, Германия). Объем камеры составлял около 50 мкл, скорость протекания раствора – 25 мл/мин, смена омывающего раствора происходила в течение 100 мс, поддерживаемая температура 36.8 ± 0.2 °C. Флуоресцентные изображения клеток записывали с помощью камеры AxioCam HSm, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (Zeiss, Германия). Регистрацию изображений производили с помощью монохромной ПЗС-камеры AxioCam HSm (Zeiss, Германия) с интервалом 30 с на протяжении всего эксперимента при низкой интенсивности возбуждающего света, что позволяло избежать выгорания флуорофора во время эксперимента. Серии цифровых изображений регистрировали с дигитализацией 12 бит в режиме линейного преобразования падающей интенсивности и сохраняли на компьютере в формате <.tif>. Измерения интенсивности флуоресценции проводили с помощью аналитической программы CytoDynamics с записью результатов измерения динамики интенсивностей индивидуальных клеток в формате таблиц Excel.

Измерение концентрации внутриклеточного натрия. Концентрацию натрия в клетках $[\text{Na}^+]_i$ определяли флуориметрическим методом с помощью флуоресцентного красителя SodiumGreen (MolecularProbes, США) согласно протоколу (Solenov, 2008). Сигнал калибровали, помещая клетки в фосфатный солевой буфер (PBS) с различной концентрацией Na^+ (138 и 10 mM в присутствии 10^{-4} M Na^+ ионофора Nystatin (AppliChem, Германия)). Гипонатриевый раствор (10 mM NaCl) готовили на основе изотонического PBS, в котором часть натрия замещали

на *n*-methyl-D-glucamine (NMDG) (ICN Biomedicals, США). Для измерения покровное стекло с клетками эндотелия переносили в раствор PBS (138 mM NaCl, 4.7 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM MgCl_2 , 5.5 mM глюкоза, 0.1 mM CaCl_2). Клетки загружали флуоресцентным красителем Sodium Green TA (10^{-5} M, 40 min 37 °C, Molecular Probes, США). Стеклянные клетки помещали в камеру флуоресцентного микроскопа. В ходе эксперимента клетки первые 10 мин (период I) находились при температуре 10 °C, затем 10 мин – при 37 °C (период II) и последующие 10 мин (период III) – в среде PBS, содержащей 10 mM Na^+ , а часть натрия была замещена органическим катионом (10 mM натрия, 128 mM NMDG) при температуре 37 °C и 10 мин в присутствии 100 ед./мл нистатина (Sigma, США). Для оценки проницаемости плазматической мембраны для ионов натрия создавали ступенчатый градиент сменой среды, содержащей 138 и 10 mM натрия. Экспериментальные записи изменения флуоресценции нормировали по амплитуде и определяли скорость изменения как внутриклеточного натрия, так и клеточного объема, находили коэффициент линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции, как это описано нами ранее (Ilyashin et al., 2014).

Анализ экспериментальных данных по динамике внутриклеточной концентрации натрия с целью получения количественных оценок проницаемости мембраны клеток для ионов натрия производили с помощью математической модели главных клеток собирательных трубок почки, разработанной нами ранее (Ильяшин и др., 2011). Исходя из средних значений интенсивности флуоресценции на стационарных участках профиля, соответствующих внутриклеточной концентрации натрия, равной 138 mM при температуре 10 °C и 10 mM в присутствии 100 ед./мл нистатина, рассчитывали стационарную концентрацию натрия в клетках при 37 °C.

Анализ микроизображений с помощью программы CytoDynamics. Для реализации компьютерной флуориметрии нами был разработан специализированный программный пакет CytoDynamics (№ госрегистра-

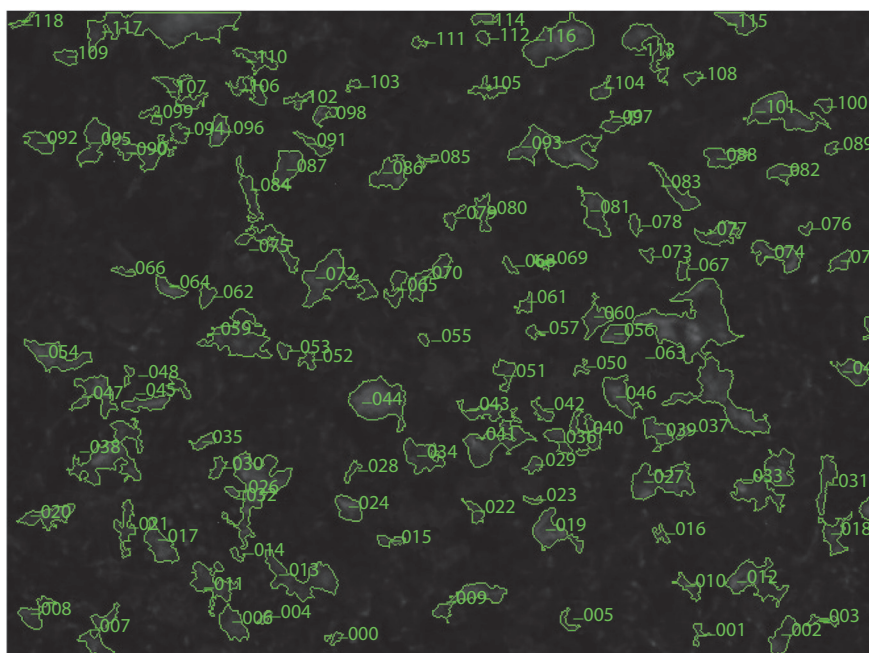


Рис. 1. Обработанное цифровое изображение препарата с выделенными ОИ.

ции 2016612766). Для математической обработки берутся файлы, получаемые непосредственно с камеры, пакет CytoDynamics определяет контуры групп и индивидуальных клеток (области интереса (ОИ)) на начальном кадре серии и удерживает контур изображения на последующих во времени снимках (рис. 1). На изображении каждой ОИ программа определяет периметр, площадь и интегральную интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна внутриклеточной концентрации натрия (Winslow et al., 2002; Конев, Пальчикова, 2015; Пальчикова и др., 2015). Осреднение интенсивности выполняется по всем изображениям одного кадра.

Статистика. Для интенсивности флуоресценции рассчитывали среднее значение, дисперсию и стандартную ошибку среднего. Для профилей, построенных на основании средних значений флуоресценции, в каждой точке рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего ($M \pm SD$). Достоверности различий определяли с применением пакета ANOVA и *t*-критерия.

Результаты

На рис. 2 приведены профили средней интегральной интенсивности флуоресценции клеток эндотелия роговицы свиньи.

В эксперименте по изучению эффекта гипотермической консервации на баланс натрия в клетках эндотелия роговицы свиньи кривая интенсивности флуоресценции имеет три характерных квазистационарных участка, на которых интенсивность флуоресценции изменяется незначительно. Это отражает стабилизацию внутриклеточной концентрации натрия в эти интервалы. Интенсивность флуоресценции в периоде II соответствует величинам равновесной внутриклеточной концентрации натрия, которая устанавливается в клетке после входа натрия через транспортеры плазматической мембраны и выхода, определяемого активностью Na/K-АТФазы. При температуре 10 °C активность Na/K-АТФазы подавлена, и в клетках устанавливается концентрация натрия, равновесная со средой (138 mM), при повышении температуры до 37 °C в результате активации натрий-калиевого насоса устанавливается более низкая равновесная концентрация внутриклеточного натрия, которая зависит от времени консервации (1 сутки: 27.3 ± 1.9 mM, $n = 110$; 10 суток: 69.2 ± 4.7 mM, $n = 70$). В третьей фазе эксперимента в присутствии ионофора в клетке устанавливается концентрация натрия, соответствующая его концентрации в калибровочном растворе (10 mM). Из анализа результатов измерений

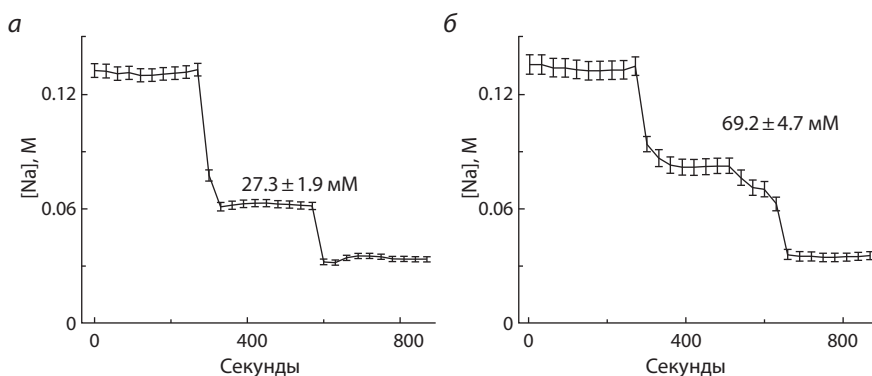


Рис. 2. Профили флуоресценции SodiumGreen в клетках эндотелия роговицы свиньи после инкубации при 4 °C: а – одни сутки; б – 10 суток.

а – концентрация внутриклеточного натрия (27.3 ± 1.9 mM, $n = 110$); б – концентрация внутриклеточного натрия (69.2 ± 4.7 mM, $n = 70$). Схема эксперимента описана в разделе «Методы».

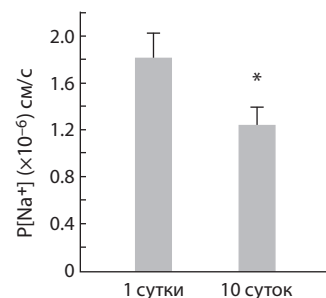


Рис. 3. Проницаемость плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы свиньи для натрия после инкубации при 4 °C: одни сутки: 1.8 ± 0.021 , $n = 10$; 10 суток: 1.2 ± 0.015 ($\times 10^{-6}$) см/с, $n = 8$.

* $p < 0.01$. Ось ординат – коэффициент проницаемости для натрия ($\times 10^{-6}$ см/с).

$[Na^+]_i$ следует, что в клетках, подвергавшихся гипотермической инкубации в течение 10 суток, происходит значительное повышение $[Na^+]_i$ по сравнению с однодневной консервацией. Определение проницаемости плазматической мембраны клеток для натрия по скорости входа иона в экспериментах со ступенчатым градиентом этого иона в изотонической среде показывает, что гипотермическая консервация в течение 10 суток привела к снижению проницаемости плазматической мембраны клеток (одни сутки: 1.8 ± 0.021 , $n = 10$; 10 суток: 1.2 ± 0.015 ($\times 10^{-6}$) см/с, $n = 8$, $p < 0.01$) (рис. 3).

В этом протоколе проведен эксперимент по влиянию состава среды на баланс внутриклеточного натрия в клетках эндотелия роговицы человека после гипотермической консервации в средах L-15 и Optisol-GS. Для эксперимента каждый фрагмент роговицы был разделен на две части, и обе части подвергались гипотермии в соответствующих средах. Как показали измерения равновесной внутриклеточной концентрации натрия после 10-суточной инкубации при 4 °C, транспортная активность клеток эндотелия значительно лучше сохранилась в специализированной среде (128 ± 14 , $n = 15$; 108 ± 14 , $n = 11$; mM, $p < 0.001$, L-15 и Optisol-GS соответственно). Ввиду малого количества материала проницаемость для натрия в эндотелии роговицы человека не определяли. В экспериментах с роговицей свиньи были установлены значения проницаемости для натрия и его равновесная концентрация в клетках после гипотермической консервации. Согласно полученным данным, гипотермическая консервация в среде L-15, которая была контролем по отношению к специализированной консервационной среде Optisol-GS, приводила к значительному повышению равновесной концентрации натрия. Можно предположить, что это обусловлено снижением транспортной активности Na/K-АТФазы.

Обсуждение

Клетки эндотелия роговицы формируют клеточный монослой, от целостности которого зависит способность эндотелия выполнять его транспортную функцию и, соответственно, регулировать осмотический баланс стромы роговицы. Так как клетки эндотелия остановлены в фазе клеточного цикла G1, они не проходят митотическое деление (Maucosk, Marshall, 2014). С возрастом часть клеток гибнет и целостность клеточного слоя сохраняется за счет оставшихся живых клеток, которые также формируют сплошной клеточный слой, но с меньшим количеством клеток. В связи этим до настоящего времени одним из основных критериев функциональности эндотелия и пригодности препарата роговицы для трансплантации является плотность клеток эндотелия (ECD), которая снижается с возрастом донора (Vianna et al., 2016). В различных глазных банках приняты минимальные пороговые значения ECD: от 2500 до 2000 (мм⁻²). (Whitcher et al., 2001; Boynton, Woodward, 2014). Этот показатель дает принципиальное представление о пригодности роговицы для транспланта-

ции, но не позволяет оценивать функциональность эндотелия как регулятора осмотического баланса матрикса. В то же время возможность определения транспортного потенциала клеток эндотелия будет иметь значение как для установления пригодности трансплантата после периода консервации, так и в исследовательских целях при изучении эффективности создаваемых рецептур новых сред для консервации. Предлагаемый в настоящей работе подход основан на анализе баланса потоков натрия индивидуальных клеток эндотелия. Трансмембранный электрохимический градиент натрия создается натрий-калиевой АТФазой и служит значимым вторичным источником энергии для транспортных процессов в клетке. Таким образом, поскольку внеклеточная концентрация натрия в организме – гомеостатическая величина, можно считать внутриклеточную активность ионов натрия адекватным показателем функциональной возможности транспортного механизма клетки.

Этот подход открывает возможность исследовать функциональное состояние транспортных систем клеток эндотелия роговицы при использовании незначительного количества исследуемой ткани. Принятое в настоящее время описание функции эндотелия посредством *pinp-leak* модели разделяет потоки активного и осмотического переноса. Поскольку интенсивность активных транспортных процессов в клетке определяется функцией Na/K-АТФазы, анализ ба-

ланса потоков натрия на уровне клетки может отражать «насосную» функцию эндотелия. Способность поддерживать градиент электрохимического потенциала натрия на плазматической мембране может служить достаточно надежным критерием функционального состояния транспортных систем клетки в целом.

Суммарные потоки натрия через плазматическую мембрану зависят от соотношения потоков натрия из клетки, что определяется активностью Na/K-АТФазы и поток натрия в клетку через транспортеры, находящиеся в мембране. Суммарная активность определяется проницаемостью мембраны для натрия (Bachmann et al., 1999; Féraille, Doucet, 2001; Solenov 2008). Повышение стационарной концентрации ионов натрия в клетках эндотелия указывает на повреждающее воздействие гипотермической консервации на транспортные механизмы. Это может объяснять высокие концентрации натрия в клетках эндотелия роговицы человека, обнаруженные нами. Поскольку в экспериментах гипотермическому воздействию подвергались препараты роговицы человека, страдавшего кератоконусом, их эндотелий исходно мог иметь сниженную функциональную активность, с чем и могут быть связаны более высокие уровни концентрации внутриклеточного натрия, выявленные в эндотелиоцитах роговицы человека. Относительно эффекта среды консервации, естественно предположить, что он связан с протекторным действием совокупности ее компонентов, повышающим сохранность и последующее восстановление активности транспортеров. Полученные результаты подтверждают исходное предположение о том, что степень восстановления транспортных функций в клетках эндотелия роговицы зависит от продолжительности гипотермического воздействия. Вопрос, в какой мере способность индивидуальных клеток эндотелия регулировать баланс внутриклеточного натрия связана с функцией регуляции осмотического баланса трансплантата, нуждается в дальнейшем изучении.

Важным выводом выполненного исследования является заключение о том, что концентрацию внутриклеточного натрия можно рассматривать как перспективный интегральный показатель функциональной компетентности клеток эндотелия исследуемого образца роговицы.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным финансированием по государственному заданию (проект № 0324-2018-0016) и грантом РФФИ № 17-04-00328.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

Ильякин А.В., Батурина Г.С., Медведев Д.А., Ершов А.П., Соленов Е.И. Исследование реакции главных клеток собирательных трубок почки на гипотонический шок. Эксперимент и математическое моделирование. *Биофизика*. 2011;56(3):550-560. [Ilyaskin A.V., Baturina G.S., Medvedev D.A., Ershov A.P., Solenov E.I. A mathematical model of the response of principal cells of collecting ducts to hypotonic shock. *Biofizika = Biophysics*. 2011; 56(3):550-560. (in Russian)]

Конев А.А., Пальчикова И.Г. Библиотека OPENCV и ее использование в задачах цитофотометрии. XI Междунар. науч. конгр. «Интерэкспо Гео-Сибирь-2015», 13–25 апр. 2015 г., Новосибирск. Материалы междунар. науч. конф. «Дистанционные методы зондирования Земли и фотограмметрия, мониторинг окружающей среды, геоэкология». В 2 т. Новосибирск: СГУГиТ, 2015;2:71-76. [Konev A.A., Palchikova I.G. The OPENCV library and its use on cytophotometry tasks. The panel “Remote Sensing of the Earth, photogrammetry, environmental monitoring, and geoecology”. The 11th International congress “Interexpo Geo-Siberia-2015”, in two volumes. Novosibirsk: SSUGT, 2015;2:71-76. (in Russian)]

Пальчикова И.Г., Конев А.А., Смирнов Е.С. Сегментация в компьютерной цитофотометрии. XI Междунар. науч. конгр. «Интерэкспо Гео-Сибирь-2015», 13–25 апр. 2015 г., Новосибирск. Материалы междунар. науч. конф. «СибОптика-2015». В 3 т. Новосибирск: СГУГиТ, 2015;2:49-55. [Palchikova I.G., Konev A.A., Smirnov E.S. Image segmentation in the computer cytophotometry. The panel “Remote Sensing of the Earth, photogrammetry, environmental monitoring, and geoecology”. The 11th International congress “Interexpo Geo-Siberia-2015”, in two volumes. Novosibirsk: SSUGT, 2015;2:49-55. (in Russian)]

Bachmann S., Bostanjoglo M., Schmitt R., Ellison D.H. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron – distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1999; 200(5):447-468.

Bonanno J.A. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog. Retin Eye Res.* 2003;22(1):69-94.

Bonanno J.A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp. Eye Res.* 2012;95:2-7.

Boynton G.E., Woodward M.A. Eye-bank preparation of endothelial tissue. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2014;25(4):319-324.

Féraille E., Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* 2001;81(1):345-418.

Ilyaskin A.V., Karpov D.I., Medvedev D.A., Ershov A.P., Baturina G.S., Katkova L.E., Solenov E.I. Quantitative estimation of transmembrane ion transport in rat renal collecting duct principal cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 2014;33(1):13-28.

Kuang K., Li Y., Yiming M., Sánchez J.M., Iserovich P., Cragoe E.J., Diecke F.P., Fischbarg J. Intracellular [Na⁺], Na⁺ pathways, and fluid transport in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 2004;79(1):93-103.

Maycock N.J., Marshall J. Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(3):e170-e184.

Otsu N.A. Threshold Selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cyber.* 1979;9(1):62-66.

Riley M., Winkler B., Czajkowski C., Peters M. The roles of bicarbonate and CO₂ in transendothelial fluid movement and control of corneal thickness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995;36:103-112.

Schmedt T., Silva M.M., Ziaei A., Jurkunas U. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp. Eye Res.* 2012;95:24-34.

Solenov E.I. Cell volume and sodium content in rat kidney collecting duct principal cells during hypotonic shock. *J. Biophys.* 2008; 2008:420963.

Vianna L.M., Li H.D., Holiman J.D., Stoeger C., Belfort R. Jr., Jun A.S. Characterization of cryopreserved primary human corneal endothelial cells cultured in human serum-supplemented media. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2016;79(1):37-41.

Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P. Corneal blindness: a global perspective. *Bull. World Health Organ.* 2001;79(3):214-221.

Winslow J.L., Cooper R.L., Atwood H.L. Intracellular ionic concentration by calibration from fluorescence indicator emission spectra, its relationship to the K(d), F(min), F(max) formula, and use with Na-Green for presynaptic sodium. *J. Neurosci. Methods.* 2002; 118(2):163-175.

The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *ZFHX3* gene and its orthologs

A.M. Kondybayeva¹, A.N. Akimniyazova², S.U. Kamenova¹, A.T. Ivashchenko²✉

¹ Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

² Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

Transcription factor gene *ZFHX3* is one of the candidate genes involved in stroke development. The *ZFHX3* protein contains oligopeptides encoded by trinucleotide repeats (TNRs). TNR variability is considered to be one of the causes of the disease, but their biological function has not yet been established. We assume that TNRs are the binding sites of miRNA to mRNA and are involved in regulation of *ZFHX3* gene expression. The characteristics of miRNA-mRNA interaction were determined using MirTarget software. It has been shown that the first TNR in mRNA of the human *ZFHX3* gene consists of the seven consecutive miR-12-32603-3p binding encoding polyGlu. The *ZFHX3* protein of human polyGlu contains 30 Glu. In the orthologous proteins of 36 animal species the length of polyGlu varied from 27 Glu to 33 Glu. Negatively charged polyGlu of the *ZFHX3* transcription factor probably interacted with positive DNA-binding proteins. The following mRNA region of the *ZFHX3* gene contained the binding sites for miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3 encoding polyAla by 15 Ala lengths. In the 33 *ZFHX3* orthologous proteins polyAla had the same length. The mRNA region of the human *ZFHX3* gene with binding polysite of miR-1322-3p encoded polyGln consisting of 19 Gln. In the 41 orthologs of the *ZFHX3* protein the length of polyGln varied from seven Gln to 23 Gln. The binding sites of miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p were located with overlapping nucleotides sequences, and encode polyPro. In *ZFHX3* human polyPro consisted of 12 Pro. In the orthologs, polyPro contained from 10 Pro to 14 Pro. The binding sites of miR-17-39416-3p, miR-9-20317-3p, miR-1-1819-3p, miR-5-15733-3p, miR-6-17815-3p, miR-18-39953-5p, miR-2-6862-5p, miR-1260b and miR-X-48174-3p in human *ZFHX3* encoded polyGly by 22 Gly length. In the 28 orthologs of *ZFHX3* the length of polyGly decreased to 11 Gly. The TNR regions could simultaneously bind several miRNAs, which increased the dependence of gene expression on miRNA. The oligopeptides encoded by the binding polysites of miRNA in mRNA in the orthologous *ZFHX3* proteins were flanked by conserved oligopeptides.

Keywords: miRNA; mRNA; *ZFHX3* gene; *ZFHX3* oligopeptides; stroke.

Характеристики полисайтов связывания миРНК с мРНК гена *ZFHX3* и его ортологов

А.М. Кондыбаева¹, А.Т. Акимниязова², С.У. Каменова¹, А.Т. Иващенко²✉

¹ Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Ген транскрипционного фактора *ZFHX3* относится к числу кандидатных генов, участвующих в развитии инсульта. В белке *ZFHX3* имеются олигопептиды, кодируемые повторами тринуклеотидов (ПТН). Изменчивость ПТН считают одной из причин заболеваний, однако их биологическая функция не установлена. Мы предполагаем, что ПТН являются сайтами связывания миРНК с мРНК и участвуют в регуляции экспрессии гена *ZFHX3*. Характеристики взаимодействия миРНК с мРНК находили по программе MirTarget. Показано, что первый ПТН в мРНК гена *ZFHX3* человека состоит из семи последовательно расположенных сайтов связывания miR-12-32603-3p, кодирующих полиGlu. В белке *ZFHX3* человека полиGlu содержит 30 Glu. В ортологических белках 36 видов животных длина полиGlu изменялась от 27 до 33 Glu. Отрицательно заряженный полиGlu транскрипционного фактора *ZFHX3*, вероятно, взаимодействует с положительно заряженными белками, связанными с ДНК. Следующий участок мРНК гена *ZFHX3* содержит сайты связывания miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3p, которые кодируют полиAla длиной 15 Ala. В 33 ортологических белках *ZFHX3* полиAla имел одинаковую длину. Участок мРНК гена *ZFHX3* человека с полисайтом связывания miR-1322-3p кодирует полиGln, состоящий из 19 Gln. В 41 ортологе белка *ZFHX3* длина полиGln изменялась от 7 до 23 Gln. Сайты связывания miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p и miR-19-43437-5p расположены с наложением нуклеотидных последовательностей и кодируют полиPro. В *ZFHX3* человека полиPro состоял из 12 Pro. У ортологов он содержал от 10 до 14 Pro. Сайты связывания miR-17-39416-3p, miR-9-20317-3p, miR-1-1819-3p, miR-5-15733-3p, miR-6-17815-3p, miR-18-39953-5p, miR-2-6862-5p, miR-1260b и miR-X-48174-3p кодировали у *ZFHX3* человека полиGly длиной 22 Gly. В 28 ортологах *ZFHX3* длина полиGly уменьшалась до 11 Gly. Участки ПТН могут одновременно связывать несколько миРНК, что увеличивает зависимость экспрессии генов от миРНК. Олигопептиды, кодируемые полисайтами связывания миРНК в мРНК, в ортологических белках *ZFHX3* фланкированы консервативными олигопептидами.

Ключевые слова: миРНК; мРНК; ген *ZFHX3*; олигопептиды *ZFHX3*; инсульт.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kondybayeva A.M., Akimniyazova A.N., Kamenova S.U., Ivashchenko A.T. The characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *ZFHX3* gene and its orthologs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):438-444. DOI 10.18699/VJ18.380

УДК 577.21

Поступила в редакцию 29.01.2018

Принята к публикации 29.04.2018

© АВТОРЫ, 2018

Some genes have been identified in stroke and they are considered as candidates to determine various subtypes of stroke (Mineharu et al., 2006; Kurzepa et al., 2014; Inose et al., 2015; Wu et al., 2017). These include the *ZFHX3* gene encoding the transcription factor involved in the regulation of expression of many genes. Disruption in *ZFHX3* gene expression was identified in stroke, atherosclerosis and other cardiovascular diseases (Liu et al., 2014; Martin et al., 2014; Chauhan et al., 2016; Hauer et al., 2017). Gene *ZFHX3*, being a transcription factor, can manifest its function in a variety of ways, and be a cause of different stroke subtypes. The gene contains trinucleotide repeats that can participate in expression of its function (Sobczak et al., 2010). It has been shown that changes in the expression of *ZFHX3* gene and other candidate stroke genes correlate with miRNA level variation (Dhiraj et al., 2013; Ji et al., 2016; Liang, Lou, 2016; Qingfeng et al., 2016; Chen et al., 2017). MicroRNAs are effective regulators of gene expression, so it is required to establish which miRNA can regulate the expression of the *ZFHX3* gene. MicroRNA interaction with mRNA is determined by the physicochemical properties of these molecules. Unfortunately, in the publications related to the subject only a few substantiated assumptions were made that led to significant errors in determining the binding sites of miRNA in mRNA and interpreting of the obtained results. Existing programs for detecting miRNA binding sites in the mRNA of target genes, unfortunately, predict many false-positive sites (Peterson et al., 2014). To search for the binding sites, we used the MirTarget program, determining the characteristics of miRNA–mRNA interaction, including the detection of multiple miRNA binding sites (Ivashchenko et al., 2014). To improve the binding sites identification their presence in the mRNA of orthologous genes was verified (Ivashchenko et al., 2013; Atambayeva et al., 2017). The identification was necessary to be aware which organisms can be selected as model organisms in the study of stroke and other cardiovascular diseases. The conducted research will help determine the effect of miRNA on the expression of *ZFHX3* and other candidate genes involved in stroke development.

Materials and methods

The nucleotide mRNA sequences of the *ZFHX3* gene and its orthologs were taken from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The following abbreviations of species names were used: *Acinonyx jubatus* – *Aju*, *Ailuropoda melanoleuca* – *Ame*, *Alligator mississippiensis* – *Ami*, *Anas platyrhynchos* – *Apl*, etc. (Supplementary table 1)¹. miRNAs were taken from miR-Base Release 21 (<http://mirbase.org>) and the article (Londin et al., 2015) (Supplementary table 2).

The search for miRNA target genes was carried out in the MirTarget program (Ivashchenko et al., 2014). The program defines the origin of miRNA binding sites with mRNA, the location of sites in the 5'-untranslated region (5'UTR), the protein-coding region (CDS) and the 3'-untranslated region (3'UTR) of mRNA, the free energy of hybridization (ΔG , kJ/mole) and schemes of miRNA nucleotides interaction with mRNA. The $\Delta G/\Delta G_m$ (%) ratio was calculated for each site, where ΔG_m is the free miRNA binding energy of a fully complementary nucleotide sequence. The miRNA binding

sites were selected to have the $\Delta G/\Delta G_m$ ratio of more than 85 %, taking into account the miRNA length and ΔG value. The position of binding sites was indicated from the first nucleotide of 5'UTR in mRNAs. The MirTarget program took into account the interactions of miRNA nucleotides with mRNA target genes not only between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C), but also between A and C, G and U, via a single hydrogen bond. The distance between A and C was equal to the G-C, A-U, and G-U distances. The numbers of hydrogen bonds in the G-C, A-U, G-U and A-C interactions were found to be 3, 2, 1 and 1, respectively. The free binding energies of these nucleotide pairs were accepted as the same values (3 : 2 : 1 : 1). The program determines the interaction of mRNA with miRNA over its entire length and allows one unpaired nucleotide in mRNA, but not in miRNA, since it is bound in the RISC complex.

Results and discussion

The miRNA binding sites in the mRNA of the *ZFHX3* gene were detected in 5'UTR, CDS, 3'UTR (Supplementary tables 3 and 4) and the vast majority of miRNA binding sites are located in the CDS. Table presents the characteristics of miRNA interaction with the mRNAs of the human *ZFHX3* gene. Some miRNAs had a single binding site in mRNA that was located separately from the binding site of the same miRNA or together with the binding sites of other miRNAs. Some miRNAs had two or more sequential binding sites, overlapped with their nucleotide sequences, we called polysites (sequentially located binding sites of the same miRNA). When polysites were located in the CDS, they encoded a sequence of one amino acid, for example, polyGln in *HTT*, *ATXN1*, *ATXN7*, *TBP*, *AR* genes, polyGly in *EVX*, *HOX*, *HOXD13*, *GATA* genes, polyGlu in *FXN* gene, polyPro in *ALG13*, *DIAPH1*, *FMNL2*, *PCLO*, *SRPK2*, *ZFHX4* genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) etc. If the binding sites of two or more different miRNAs were located with overlapping nucleotide sequences, this mRNA site was called a multiple site. Messenger RNAs of the *ZFHX3* gene contain both poly- and multiple sites.

None of the known programs for search of miRNA binding site has been able to search for such sites. Each of the sites included in multiple miRNA binding sites can have the same miRNA interaction characteristics with mRNA. However, there are polysites and multiple miRNA binding sites including a binding site with higher mRNA–miRNA interaction characteristics. This causes a longer residence time for the RISC complex in this binding site. The remaining sites increase the probability of catching the RISC complex. With a large number of binding sites in polysites and multiple sites, mRNA can bind two or more RISC complexes including miRNA. The identification of all miRNAs that bind to mRNA of *ZFHX3* gene is necessary to evaluate their effect on the expression of *ZFHX3* gene and to determine the dependence of its expression on the expression of other genes that are targets for these miRNAs.

The simplistic understanding of the relationship between miRNA and a target gene is widely spread and states that if the binding of miRNA to the gene mRNA is established, the problem is regarded as solved. However, for this miRNA, there may be other target genes with stronger interaction, or the mRNA of one gene can interact with several miRNAs.

¹ Supplementary tables 1–16 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx7.pdf>

Characteristics of miRNA interaction in CDS mRNAs of *ZFHX3* gene

miRNA	The beginning of site, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	The length, nt
miR-2-8257-5p	969	-125	88	23
miR-20-23817-3p	1810	-132	86	24
miR-12-32603-3p	2062–2113 (7)	-108 ÷ -115	86–92	23
miR-6891-3p	2120	-106	93	21
miR-17-39416-3p	2978–2996 (4)	-115	87	22
miR-1-1819-3p	2982	-121	88	23
miR-5-15733-3p	2986–3004 (3)	-127 ÷ -129	86–87	24
miR-9-20317-3p	2986–3001 (4)	-127 ÷ -129	86–87	24
miR-1322	5836–5858 (7)	-85	83	19
miR-11-29856-3p	6025	-110	93	23
miR-2-6184-3p	6793–6794 (2)	-110 ÷ -117	85–90	23
miR-5-14114-5p	6793–6802 (3)	-119 ÷ -123	86–89	23
miR-19-43437-5p	6798	-110	87	23
miR-3692-5p	8410	-119	90	24
miR-1322	10262–10271 (4)	-87 ÷ -91	85–90	19
miR-9-25681-5p	10261–10264 (2)	-100 ÷ -102	85–87	21
miR-1322	10798–10823 (4)	-83 ÷ -87	81–85	19
miR-671-5p	10874	-119	90	23
miR-6779-5p	10868	-113	93	21
miR-17-39416-3p	11193–11232 (12)	-113 ÷ -121	85–92	22
miR-9-20317-3p	11201–11234 (9)	-127 ÷ -136	87–91	24
miR-1260b	11201–11228 (6)	-89 ÷ -93	86–90	19
miR-X-48174-3p	11207–11216 (2)	-121	85	24
miR-1-1819-3p	11211–11229 (2)	-119	86	23
miR-18-39953-5p	11212–11230 (3)	-123	86	23
miR-6-17815-3p	11214	-127	86	24
miR-2-6862-5p	11218	-118	86	23
miR-5-15733-3p	11234–11240 (2)	-127 ÷ -129	86–87	24
miR-3960	11461–11483 (5)	-102 ÷ -113	81–90	20
miR-5-14114-5p	11461	-121	88	23
miR-19-21199-3p	11462–11468 (2)	-134 ÷ -138	85–88	25
mir-1-2121-3p	11463	-142	91	25
miR-1-2770-3p	11463	-123	87	24
miR-19-33623-3p	11463	-136	91	24
miR-2-6184-3p	11481	-113	87	23

Note: The number of miRNAs binding sites is indicated in parentheses.

Therefore, it is necessary, at least computationally, to know which miRNAs can bind to the genomic mRNA genes. This task can be successfully solved using our program that predicts miRNA – mRNA binding sites and determines the quantitative characteristics of this interaction.

In the mRNA protein-coding region of the *ZFHX3* gene, the miR-2-8257-5p binding site is located first and encodes the PSARPPPP octapeptide (Supplementary table 5). This binding site is present in the mRNA orthologs of the *ZFHX3* gene and

encodes an identical peptide or it is different by one or more amino acids. The QTYMEHHC peptide in front of it and the LREESASD peptide behind it are absolutely conserved in the *ZFHX3* protein of 23 animals.

The binding site of miR-20-23817-3p was located at the beginning of mRNA nucleotide sequence and encoded the PAG-SAAGP octapeptide in the orthologous proteins of 20 animal species (Supplementary table 6). In the orthologous proteins of other animal species, the miR-20-23817-3p binding site

included nucleotide substitutions and encoded octapeptides different from PAGSAAGP. However, the characteristics of miR-20-23817-3p interaction with mRNA of *ZFH3* gene of these species were comparable to those for the first group of animals, which indicated the functional ability of miR-20-23817 to regulate the *ZFH3* gene expression in these animal species. Notably, the oligopeptides MEGEEAL and EQPQAGLL adjoining to the oligopeptide encoded by the miR-20-23817-3p binding sites are absolutely conserved in the *ZFH3* protein of studied animal species.

For miR-12-32603-3p seven binding sites were identified in the mRNA of the *ZFH3* gene (see Table). They encoded polyGlu replacing two Glu positions with Ala (Supplementary table 7). The presence of polysite for miRNA binding site promoted capture of the RISC complex and its further advantageous finding in the position of the site with the maximum free energy of mRNA-miRNA interactions. The site for miR-12-32603-3p was located in the region from 2080 nt for which ΔG and $\Delta G/\Delta G_m$ values were maximum: -115 kJ/mole and 92 %, respectively. MicroR-6891-3p binding site encodes the EEEEEDE hexapeptide. It should be noted that in the 2D structure of the encoding polyGlu sites there was no intramolecular interaction of nucleotides and the entire polysite nucleotide sequence was capable of binding several RISC complexes. The mRNA region adjacent to the miRNA binding polysites from the 3'-end encoded D(E)EGCKGLF oligopeptide, and the region from the 5'-end encoded FSEKA(V)EPA oligopeptide (see Supplementary table 7). MicroR-12-32603-3p binding sites encodes from 27 to 33 amino acids in the *ZFH3* orthologous proteins. The functional role of polyGlu in the *ZFH3* protein has not been described in the literature. It is possible that hydrophilic polyGlu imparts high solubility to the transcription factor *ZFH3* and ensures its interaction with positively charged DNA-binding proteins, freeing up DNA for transcription. It means that the region of miR-12-32603-3p binding sites performs two functions: a) provides suppression of the synthesis of the transcription factor *ZFH3* by miRNA and as a result blocks the expression of *ZFH3*-dependent genes, b) without or with a lower concentration of miR-12-32603-3p, compared to the concentration of the mRNA of *ZFH3* gene, the polysite encodes a polyGlu necessarily for the functioning of the transcription factor. The synonymous codons of miR-12-32603-3p binding sites in mRNA of *Hsa*, *Mmu* and *Hgl* are used in the $GAG_{19}GAA_8GCG_2$, $GAG_{18}GAA_9GCG_1GCA_1$ and $GAG_{20}GAA_9GCG_1GCA_1$ ratios, respectively. In the third position of the codons for Glu and Ala, guanine is used.

The next region of mRNA gene containing the binding sites of miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3p, was located in the region from 2978 nt to 3027 nt (see Table). From the 5'-end to the multiple binding sites adjoins the site of mRNA region, encoding the absolutely conservative GGEQVFSH octapeptide (Supplementary table 8). From the 3'-end of the binding sites, a less homologous oligopeptide was encoded. The binding sites of miR-17-39416-3p encoded the TAGAAAAA, GAAAAAVA, AAAAFAAA and AAVAAAAA oligopeptides. The binding sites of miR-5-15733-3p encoded the AAAAFAAA, AAVAAAAA and AAAAAAAN octapeptides. The binding sites of miR-9-20317-3p encoded the AAAAFAAA, AAVAAAAA, AVAAAAA and VAAAAAAA

oligopeptides. Therefore, the mRNA region of *ZFH3* gene, with overlapping multiple sites, was a compact target for three miRNAs that competed with each other for the binding site. The highest value of free binding energy ($\Delta G = -129$ kJ/mole) was in miR-5-15733-3p and miR-9-20317-3p, which indicates a significant effect on the mRNA translation of the *ZFH3* gene with an equal concentration of miRNA and mRNA. The *ZFH3* protein regions encoded by the binding sites of miRNAs studied above were identical in mice and rats and differed a little from those in humans (see Supplementary table 8). While the functional role of polyAla in the *ZFH3* protein remains unknown, the 2D structure of the encoding polynucleotide in mRNA makes it easy to bind miRNA due to the small number of intramolecular interactions of the nucleotides of this mRNA region. Synonymic codons miR-12-32603-3p binding sites in mRNA of *Cca* are $GCG_6GCA_6GCC_1GCT_1$, *Hsa* – $GCG_9GCA_1GCC_1GCT_1$, *Mmu* – $GCG_2GCA_3GCC_7GCT_1$, *Ppa* – $GCG_{11}GCA_1GCC_1GCT_1$, *Rno* – $GCG_2GCA_4GCC_6GCT_1$.

Another mRNA region with the miR-1322 binding polysite encoded polyGln (Supplementary table 9). The first binding site encoded the RQQQQQ hexapeptide. In humans polyGln consisted of 19 Gln, and in rats and mice – from 14 and 13 Gln, respectively, which could affect the expression degree of the polyGln function. The miR-1322 binding sites in the mRNA of the *ZFH3* gene of all studied animal species were located between the nucleotide sequences encoding the conservative LADMIAS (from the 5'-end) and AQTLAQAQ (from the 3'-end) oligopeptides. Only in *Xtr* polyGln Gln changed to Leu. The function of polyGln remains unknown. We assume that the polysite binds to miR-1322, so the encoded polyGln of *ZFH3* transcription factor can interact with negatively charged regions of DNA-binding proteins. Another our assumption is that the polyGln variability of *ZFH3* protein is associated with the development of several diseases, but the way it happens remains unknown (Liu et al., 2014; Martin et al., 2014; Chauhan et al., 2016; Hauer et al., 2017). Synonymic codons miR-12-32603-3p binding sites in mRNA of *Cfa* are CAA_6CAG_{21} , *Cfe* – CAA_2CAG_{20} , *Hsa* – $CAA_{13}CAG_6$, *Phu* – CAA_5CAG_{18} , *Ssc* – CAA_7CAG_{14} , *Tch* – CAA_5CAG_{14} .

The binding site of miR-11-29856-3p encoded the absolutely conservative heptapeptide TETLLQL, presented in the protein of 55 species of animals (Supplementary table 10). Absolutely conservative heptapeptide LLPHPMT adjoined the N-terminus of the heptapeptide, and the variable region of the *ZFH3* protein – the C-terminus. The high conservation of miR-11-29856-3p binding site suggested the important role of this miRNA in regulating the expression of *ZFH3* gene even in the early stages of animal evolution since its binding site is present in *Xtr*.

Supplementary table 11 presents the variability data of multiple binding sites miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p encoding the PPPPPPP heptapeptide for an equal length. While the 5'-end of the multiple sites encoded absolutely conserved octapeptide PLRPQTPE, the LPAAPPQP octapeptide was located at the 3'-end. As far as stroke markers are concerned, it is possible to assume there is an association between miR-5-14114-5p and miR-2-6184-3p with the target gene *ZFH3* whose binding sites have the ΔG values of -123 kJ/mole and -117 kJ/mole, respectively. The functional value of polyPro is unknown. Synonymic codons

of miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p binding sites in mRNA of *Hsa* were CCA₆CCU₃CCC₃, *Mmu* – CCA₂CCU₄CCC₃CCG₃, *Rno* – CCA₄CCU₂CCC₅CCG₁, *Xtr* – CCA₄CCU₈CCC₁.

The absolute conservativeness of the SNPLLASQ octapeptide encoded the miR-3692-5p binding site in the mRNA of *ZFHX3* gene of 57 animal species (Supplementary table 12). The 5'-end of the binding site encoded the absolutely conserved PLRPQTPE octapeptide. From the 3'-end of the SNPLLASQ octapeptide, the highly conserved octapeptide LLSGAIPQ was located in most animal species. With $\Delta G = -119$ kJ/mole and the $\Delta G/\Delta G_m$ value of 90 %, the association of miR-3692-5p with the target gene *ZFHX3* could serve as a stroke marker. MicroR-3692-5p was co-expressed with the gene of the ZDHHC14 transcription factor, which is expressed in many tissues as an oncosuppressor (Yeste-Velasco et al., 2014).

In the region from 10798 nt to 10890 nt, three binding sites of miR-1322-3p separated by codons into a RQL tripeptide and a KV dipeptide were located in the human gene mRNA (Supplementary table 13). In *ZFHX3* gene mRNA of other animal species, these miR-1322-3p binding sites differed significantly in the number of codons and in the number of encoded Gln, accordingly. For example, in the rat *ZFHX3* gene the first polysite encoded 15 Gln, the second polysite encoded 8 Gln and the third polysite – again 15 Gln. Therefore, the rat could not be an adequate model for studying diseases in which polyGln is involved in the *ZFHX3* protein. The longest polypeptide of 33 Gln was encoded by the second binding site in the *ZFHX3 Pma* mRNA.

The miR-6779-5p and miR-671-5p binding sites of the human *ZFHX3* gene mRNA overlapped with nucleotide sequences encoding the QTPVPP and PVPPGAP, oligopeptides, respectively (Supplementary table 14). Substitution of Pro for Ser, Gln, Thr or Ala in different animal species was a reflection of changes in one nucleotide in the binding site. However, the energy of miR-6779-5p and miR-671-5p interaction with the *ZFHX3* gene mRNA varied insignificantly. QTPVPPGAP-bound oligopeptides QPKAS and SPDKDPAK were highly conserved in the vast majority of species, so they probably perform a highly significant function in the *ZFHX3* protein.

Supplementary table 15 shows the variability of the amino acids encoded by the binding sites of nine miRNAs in the orthologous *ZFHX3* gene mRNA. The mRNA region located from 11193 nt to 11264 nt overlapping of the nucleotide sequences of the nine miRNA binding sites encoded polyGly with one substitution of Gly by Ser. The twelve miR-17-39416-3p binding sites encoded the GGGGGGSG, GGGGSGGG, GGSGGGGG, GSGGGGGG, SGGGGGGG octapeptides and the seven GGGGGGGG octapeptides. The binding sites in positions between 11223 nt and 11232 nt had the greatest free binding energy ΔG equal to -121 kJ/mole and the $\Delta G/\Delta G_m$ value of 92 %. Nine miR-9-20317-3p binding sites in the mRNA of the human *ZFHX3* gene encoded the GGGSGGG oligopeptide, seven GGGGGGGG oligopeptides and a GGGGGGGS oligopeptide. The two miR-1-1819-3p binding sites and one miR-6-17815-3p binding site encoded GGGGGGGG. The miR-18-39953-5p and miR-2-6862-5p binding sites encoded one of the GGGGGGGG heptapeptide. MicroR-1260b had six binding sites, encoding one GGSGGG

and five GGGGGG hexapeptides. miR-5-15733-3p binding sites encoded GGGGGGGS and GGGGGSYH. Two binding sites of miR-X-48174-3p encoded oligopeptides GSGGGGGG and GGGGGGGG. Synonymic codons of miRNA binding sites in mRNA of *Cca*, *Nga* and *Lve* were used in the ratios GGC₁₅GGU₃, GGC₁₆GGU₁ and GGC₁₃GGU₃, respectively. In the third position of synonymous codons, only pyrimidines were used.

As it has been mentioned above, the miR-9-20317-3p binding site encoded the AAAAAAA oligopeptide (see Supplementary table 8). In the mRNA region from 11193 nt to 11264 nt the miR-9-20317-3p binding site encoded the GGGGGGGG oligopeptide (see Supplementary table 15). This explains why, for example, the nucleotide sequence gcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg can be translated into three reading frames, where the first reading frame corresponds to the AAAAAAA oligopeptide, the second reading frame – to the RRRRRR oligopeptide and the third reading frame – to the GGGGGG oligopeptide. For this reason, the miR-5-15733-3p and miR-17-39416-3p binding sites in the region encoded polyAla, and in the mRNA region from 11193 nt to 11264 nt – polyGly. The assumption that a single nucleotide sequence of binding polysites can encode the oligopeptide in the three reading frames has been confirmed in the study of miR-1322-3p binding with the mRNA of 48 human genes that demonstrated the way of polyGln, polySer and polyAla were encoded by miR-1322-3p (Niyazova et al., 2015; Atambayeva et al., 2017). Synonymic codons of the miRNA binding sites in the mRNAs of *Hsa*, *Csa* and *Pab* were used in the ratios GGC₁₈GGU₂AGU₁, GGC₁₅GGU₅AGU₁ and GGC₁₆GGU₂AGU₁, respectively. In the third position of binding sites synonymic codons only pyrimidines were used. In *Cca*, *Nga* and *Lve* mRNAs were no Ser among polyGly, and synonymic codons kept the advantageous use of GGC codons: GGC₁₅GGU₃, GGC₁₆GGU₁, GGC₁₃GGU₃. In the third position of synonymous codons, only pyrimidines are used.

From 11461 nt to 11503 nt seven miRNA had one to five mRNA binding sites (see Table). Supplementary table 16 shows the variability of the amino acids encoded by the binding sites of these miRNAs. Two miR-19-21199-3p binding sites encoded the PPPPSAAAP and PPSAAAPSS nonapeptides. The miR-1-2121-3p and miR-19-33623-3p binding sites encoded the same PPPPSAAAP nonapeptide. One binding site of miR-5-14114-5p encoded the PPPPSAAA octapeptide. The miR-1-2770-3p and miR-2-6184-3p binding sites encoded the PPPPSAAA and AAPSSASP octapeptides. Three miR-3960 binding sites encoded heptapeptides PPPPSAA, PPPSAAA and PPSAAAP. The binding sites of seven miRNAs in rat and mouse mRNAs were not different from those in humans; only an Ala codon was converted into a Ser one, which had little effect on the energy of miRNA interaction with mRNA in this region, so rats and mice can serve as adequate models for studying the effect of these miRNAs on the *ZFHX3* gene expression.

The transcription factor *ZFHX3* gene is unique for several reasons. Its mRNA contains binding sites for 26 miRNAs, so its expression depends on several host genes that are co-expressed with their miRNA (Hoepfner et al., 2009; Ma et al., 2011; He et al., 2012; Li et al., 2015), or are dependent on the expression of miRNA genes that are located between protein-coding genes.

For some miRNAs in mRNA there are polysites encoding oligopeptides: polyGlu, polyAla, polyPro, polyGly, polyGln.

A mRNA contains several regions that include multiple binding sites for several miRNAs with overlapped nucleotide sequences. Most of the studied binding sites are located in the protein-coding region, which allows us to assume the function of the encoded oligopeptides. Changes in codon usage frequencies and their location in binding sites encoding oligopeptides do not significantly affect the energy of miRNA interaction with the *ZFHX3* gene mRNA. For three miRNAs there are two homologous sites separated by 8215 nt, containing miRNA binding sites. These regions encoded oligopeptides in two different reading frames corresponding to the binding sites of these miRNAs. These duplicating regions of miRNA binding sites increase the control of these miRNAs for the *ZFHX3* gene expression, which indicates that miRNA binding sites are “indifferent” to what they encode. In some cases, the encoded oligopeptides can perform the necessary function for the *ZFHX3* protein. For example, polyGlu oligopeptide can interact with positively charged DNA-binding proteins.

When selecting miRNA and mRNA associations as a marker of the disease one should meet the following conditions: (1) high binding energy of miRNA with mRNA; (2) high $\Delta G/\Delta G_m$ value; (3) the presence of multiple binding sites in mRNA for miRNA; (4) certain degree of conservatism of miRNA binding sites in orthologous gene mRNAs. On these grounds, it is proposed to use the miR-20-23817, miR-9-20317-3p, miR-19-21199-3p, miR-19-33623-3p and miR-1-2121-3p associations with the *ZFHX3* gene mRNAs as markers for the diagnosis of stroke and other diseases for which *ZFHX3* gene is the candidate gene causing their development. These miRNAs were associated with mRNA of gene with a free energy ΔG value equal to -130 kJ/mole and more.

In the experiments establishing the role of miRNA in the regulation of gene expression, it is necessary to consider the following circumstances, which in many publications are not taken into account. MicroRNAs in a complex with RISC bind to mRNA and manifest themselves as inhibitors of translation, therefore the description of their action used in biochemistry is applicable.

The miRNA interaction mRNA is determined by the physicochemical properties of these molecules. Unfortunately, in the study of this interaction, little-grounded assumptions were made that led to significant errors in the determination of miRNA binding sites in mRNA and interpretation of the obtained results. Existing programs for identification of miRNA binding sites in mRNA of target genes, unfortunately, predict many false-positive sites (Peterson et al., 2014). To increase the reliability of the predicted binding sites, we have studied orthologous genes of different animal species (Atambayeva et al., 2017).

Conclusion

The mRNA of the *ZFHX3* gene contains binding sites for 26 miRNAs. This fact indicates a strong dependence of the *ZFHX3* gene expression on miRNA. The binding sites of these miRNAs are found in the protein-coding region of the *ZFHX3* gene mRNA and encode the oligopeptides located between the conservative flanking *ZFHX3* protein oligopeptides. Identical nucleotide sequences of binding sites of one miRNA located

in different locations of mRNA encode different oligopeptides in different reading frames. The mRNA of the *ZFHX3* gene contains consecutively located binding sites for one or more miRNAs that encode oligopeptides.

The identified miRNAs can be used as a marker of disease development involving *ZFHX3* gene. The impact effectiveness of each miRNA on the expression of *ZFHX3* gene depends on the free energy of their interaction and on the ratio of miRNA concentrations, since the miRNA binding sites (RISC) coincide or overlap. In addition, the ratio of miRNA and mRNA of *ZFHX3* gene concentrations is very important. The prolonging length of the miRNA binding polysites increases the probability of the interaction of one or more miRNAs with mRNA of *ZFHX3*. The detection of miRNA binding sites in mRNA of paralogous genes allows to determine the adequacy of experimental animals for studying the diseases caused by the effect of miRNA.

Acknowledgements

We would like to thank our study individuals for their generous participation in this study. This study was supported by a grant from the Ministry of Education and Science, Kazakhstan Republic, SRI of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

- Atambayeva S., Niyazova R., Ivashchenko A., Pyrkova A., Pinsky I., Akimniyazova A., Labeit S. The binding sites of miR-619-5p in the mRNAs of human and orthologous genes. BMC Genomics. 2017; 18(1):1-10. DOI 10.1186/s12864-017-3811-6.
- Chauhan G., Debette S. Genetic risk factors for ischemic and hemorrhagic stroke. Curr. Cardiol. Rep. 2016;18(12):1-11. DOI 10.1007/s11886-016-0804-z.
- Chen Y., Song Y., Huang J., Qu M., Zhang Y., Geng J., Zhang Z., Liu J., Yang G.Y. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke. Front. Neurol. 2017;8:57. DOI 10.3389/fneur.2017.00057.
- Dhiraj D., Chrysanthou E., Mallucci G., Bushell M. miRNAs-19b, -29b-2* and -339-5p show an early and sustained up-regulation in ischemic models of stroke. PLoS One. 2013;8(12):e83717. DOI 10.1371/journal.pone.0083717.
- Hauer A., Pulit S., van den Berg L., de Bakker P., Veldink J., Ruigrok Y. A replication study of genetic risk loci for ischemic stroke in a Dutch population: a case-control study. Sci. Rep. 2017;7(1):1-5. DOI 10.1038/s41598-017-07404-4.
- He C., Li Z., Chen P., Huang H., Hurst L., Chen J. Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: Implications of miRNA host gene coevolution. Nucleic Acids Res. 2012; 40(9):4002-4012. DOI 10.1093/nar/gkr1312.
- Hoepfner M., White S., Jeffares D., Poole A. Evolutionarily stable association of intronic snoRNAs and microRNAs with their host genes. Genome Biol. Evol. 2009;1:420-428. DOI 10.1093/gbe/evp045.
- Inose Y., Kato Y., Kitagawa K., Uchiyama S., Shibata N. Activated microglia in ischemic stroke penumbra upregulate MCP-1 and CCR2 expression in response to lysophosphatidylcholine derived from adjacent neurons and astrocytes. Neuropathology. 2015;35(3):209-223. DOI 10.1111/neup.12182.
- Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva Sh. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes. Bioinformation. 2014;10(7):423-427. DOI 10.6026/97320630010423.
- Ivashchenko A., Issabekova A., Berillo O. miR-1279, miR-548j, miR-548m, and miR-548d-5p binding sites in CDSs of paralogous and

- orthologous *PTPN12*, *MSH6*, and *ZEB1* genes. Biomed. Res. Int. 2013;2013:1-11. DOI 10.1155/2013/902467.
- Ji Q., Ji Y., Peng J., Zhou X., Chen X., Zhao H., Xu T., Chen L., Xu Y. Increased brain-specific MiR-9 and MiR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients. PLoS One. 2016;11(9):1-14. DOI 10.1371/journal.pone.0163645.
- Kurzepa J., Kurzepa J., Golab P., Czerska S., Bielewicz J. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. Int. J. Neurosci. 2014;124(10):707-716. DOI 10.3109/00207454.2013.872102.
- Li N., Yang J., Cui L., Ma N., Zhang L., Hao L. Expression of intronic miRNAs and their host gene *Igf2* in a murine unilateral ureteral obstruction model. Braz J. Med. Biol. Res. 2015;48(6):486-492. DOI 10.1590/1414-431X20143958.
- Liang T.Y., Lou J.Y. Increased expression of mir-34a-5p and clinical association in acute ischemic stroke patients and in a rat model. Med. Sci. Monit. 2016;22:2950-2955. DOI 10.12659/MSM.900237.
- Liu Y., Ni B., Lin Y., Chen X.G., Fang Z., Zhao L., Hu Z., Zhang F. Genetic polymorphisms in *ZFHX3* are associated with atrial fibrillation in a Chinese Han population. PLoS One. 2014;9(7):101318. DOI 10.1371/journal.pone.0101318.
- Londin E., Loher P., Telonis A.G., Quann K., Clark P., Jing Y., Hatzimichael E., Kirino Y., Honda S., Lally M., Ramratnam B., Comstock C.E.S., Knudsen K.E., Gomella L., Spaeth G.L., Hark L., Katz L.J., Witkiewicz A., Rostami A., Jimenez S.A., Hollingsworth M.A., Yeh J.J., Shaw C.A., McKenzie S.E., Bray P., Nelson P.T., Zupo S., Roosbroeck K.V., Keating M.J., Calin G.A., Yeo C., Jimbo M., Cozzitorto J., Brody J.R., Delgrosso K., Mattick J.S., Fortina P., Rigoutsos I. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015;112(10):1106-1115. DOI 10.1073/pnas.1420955112.
- Ma N., Wang X., Qiao Y., Li F., Hui Y., Zou C., Jin J., Lv G., Peng Y., Wang L., Huang H., Zhou L., Zheng X., Gao X. Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. Mol. Cell. Endocrinol. 2011;333(1):96-101. DOI 10.1016/j.mce.2010.11.027.
- Martin R., Owens W., Cunningham M., Mayosi B., Koref M., Kevavney B. Chromosome 16q22 variants in a region associated with cardiovascular phenotypes correlate with *ZFHX3* expression in a transcript-specific manner. BMC Genet. 2014;15:1-7. DOI 10.1186/s12863-014-0136-1.
- Mineharu Y., Inoue K., Inoue S., Yamada S., Nozaki K., Takenaka K., Hashimoto N., Koizumi A. Association analysis of common variants of *ELN*, *NOS2A*, *APOE* and *ACE2* to intracranial aneurysm. Stroke. 2006;37(5):1189-1194. DOI 10.1161/01.STR.0000217408.91389.4d.
- Niyazova R., Berillo O., Atambayeva Sh., Pyrkova A., Alybaeva A., Ivashchenko A. miR-1322 binding sites in paralogous and orthologous genes. Biomed. Res. Int. 2015: 962637. DOI 10.1155/2015/962637.
- Peterson S., Thompson J., Ufkin M., Sathyanarayana P., Liaw L., Congdon C. Common features of microRNA target prediction tools. Front. Genet. 2014;5:1-10. DOI 10.3389/fgene.2014.00023.
- Qingfeng M., Haiping Zh., Zhen T., Rongliang W., Ping L., Ziping H., Shubei M., Yumin L., Jianping J. MicroRNA-181c exacerbates brain injury in acute ischemic stroke aging and disease. Aging Dis. 2016;7(6):705-714. DOI 10.14336/AD.2016.0320.
- Sobczak K., Michlewski G., de Mezer M., Kierzek E., Krol J., Olejniczak M., Kierzek R., Krzyzosiak W. Structural diversity of triplet repeat RNAs. J. Biol. Chem. 2010;285(17):12755-12764. DOI 10.1074/jbc.M109.078790.
- Wu Q., Wu H., Orlov Yu.L., Gegentana G., Huo W., Bragin A.O., Wu N., Suyalatu S., Zhao F., Zhao J., Tabikhanova L.E., Chen M., Bai H. Genetic polymorphisms and related risk factors of ischemic stroke in a Mongolian population in China. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):581-587. DOI 10.18699/VJ17.275.
- Yeste-Velasco M., Mao X., Grose R., Kudahetti S., Lin D., Marzec J., Vasiljević N., Chaplin T., Xue L., Xu M., Foster J., Karnam S., James S., Chioni A., Gould D., Lorincz A., Oliver R., Chelala C., Thomas G., Shipley J., Mather S., Berney D., Young B., Lu Y. Identification of *ZDHHC14* as a novel human tumour suppressor gene. J. Pathol. 2014;232(5):566-577. DOI 10.1002/path.4327.



Ассоциация полиморфизма генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз с уровнем гуморального иммунного ответа после вакцинации против клещевого энцефалита

Н.С. Юдин^{1, 2, 3}✉, А.В. Игошин¹, С.Л. Лутова⁴, Я. Гон², М.И. Воевода^{1, 2, 3}, В.А. Белявская⁵

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Городская поликлиника № 14», Новосибирск, Россия

⁵ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Россия

Вакцинация является эффективным средством профилактики клещевого энцефалита, формирующим активный иммунитет. Однако избыточная иммунизация при вакцинации неоправдана с точки зрения экономики и медицинской этики. Одним из подходов к индивидуализации вакцинации может быть подбор доз вакцины в зависимости от ожидаемого уровня иммунного ответа пациента. Поэтому возникает необходимость разработки методов оценки потенциального уровня иммунологических реакций человека до проведения вакцинации. Цель работы – поиск возможных ассоциаций однонуклеотидных полиморфных маркеров (ОНП) в генах *OAS2* и *OAS3*, для которых ранее была найдена корреляция с развитием тяжелых форм клещевого энцефалита, а также с образованием антител и цитокинов после вакцинации против клещевого энцефалита. В исследовании приняли участие 97 добровольцев обоего пола, ранее не вакцинированных и не имевших контактов с клещами. Через один месяц после иммунизации вакциной «ЭнцеВир» у них брали пробы венозной крови. Анализировали уровни специфических антител IgG против вируса клещевого энцефалита и интерлейкина 4 (ИЛ-4). Генотипировали ОНП rs2285932, rs2072136, rs1293762, rs15895 и rs1732778 в генах 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз *OAS2* и *OAS3*. Выработка антител в ответ на введение вакцины была достоверно ассоциирована с ОНП rs1732778 в регуляторном районе гена *OAS2*. Этот показатель оказался существенно выше у людей с гетерозиготным генотипом G/A, чем у субъектов с гомозиготными генотипами G/G и A/A. Индивидуальные носители аллеля A в составе генотипов G/A и A/A этого же ОНП имели сниженный уровень ИЛ-4 по сравнению с гомозиготными индивидами G/G. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ОНП rs1732778 в регуляторной области гена *OAS2* ассоциирован с образованием противовирусных антител IgG и уровнем ИЛ-4 после вакцинации. По-видимому, генетический полиморфизм в гене *OAS2* следует принимать во внимание при индивидуализации вакцинопрофилактики клещевого энцефалита.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вакцинация; IgG антитела; ген; *OAS2*; *OAS3*; однонуклеотидный полиморфизм; ассоциация.

Association between polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the humoral immune response upon vaccination against tick-borne encephalitis

N.S. Yudin^{1, 2, 3}✉, A.V. Igoshin¹, S.L. Lutova⁴, Ya. Gon², M.I. Voevoda^{1, 2, 3}, V.A. Belyavskaya⁵

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ State Budgetary Health Care Institution of the Novosibirsk Region "City Hospital № 14", Novosibirsk, Russia

⁵ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Well-being, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

Vaccination forms active immunity and represents an effective way of preventing tick-borne encephalitis (TBE). However, excessive vaccination is unjustified in terms of economics and medical ethics. One of the individualized approaches to vaccines is the selection of vaccine doses depending on the expected levels of immune response. Therefore, there is a need for new methods for assessing potential human immune responses prior to vaccination. The aim of this study was to find a possible correlation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within *OAS2* and *OAS3* genes, which have previously been associated with the development of severe forms of TBE, and the formation of antibodies and cytokines upon vaccination against TBE. The study involved 97 volunteers of both sexes who had not previously been vaccinated against TBE and had no contact with ticks. Venous blood samples were collected one month after vaccination against TBE using the EnceVir vaccine. Levels of specific IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) and interleukin 4 (IL-4) were analyzed. Genomic DNA samples were genotyped for the single nucleotide polymorphisms rs2285932, rs2072136, rs1293762, rs15895 and rs1732778 in the *OAS2* and *OAS3* genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases. Antibody production in response to vaccine administration was significantly associated with SNP rs1732778 in the regulatory

region of the *OAS2* gene. This indicator was significantly higher in people with heterozygous genotypes G/A as compared to people with homozygous genotypes G/G and A/A. Carriers of the A allele (G/A or A/A genotypes) of the same SNP had reduced IL-4 levels as compared to those in the homozygous G/G individuals. Thus, the data obtained indicate that SNP rs1732778 in the regulatory region of the *OAS2* gene correlates with the formation of antiviral IgG antibodies and changes in IL-4 levels upon vaccination. Evidently, the genetic polymorphism in *OAS2* gene should be considered when performing individualized TBE vaccinations.

Key words: tick-borne encephalitis; vaccination; IgG antibodies; gene; *OAS2*; *OAS3*; single nucleotide polymorphism; correlation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Юдин Н.С., Игошин А.В., Лутова С.Л., Гон Я., Воевода М.И., Белявская В.А. Ассоциация полиморфизма генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз с уровнем гуморального иммунного ответа после вакцинации против клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):445-451. DOI 10.18699/VJ18.381

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yudin N.S., Igoshin A.V., Lutova S.L., Gon Ya., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A. Association between polymorphisms in genes encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the humoral immune response upon vaccination against tick-borne encephalitis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):445-451. DOI 10.18699/VJ18.381

Клещевой энцефалит – природно-очаговая вирусная инфекция, которая характеризуется лихорадкой, интоксикацией и поражением серого вещества головного мозга (энцефалит) и/или мозговых оболочек (менингит и менингоэнцефалит) (Иерусалимский, 2001). Заболевание может привести к стойким неврологическим и психиатрическим осложнениям и даже смерти больного. Возбудитель клещевого энцефалита – РНК-содержащий вирус (ВКЭ), относящийся к семейству *Flaviviridae*. Основным резервуаром, поддерживающим существование возбудителя в природе, являются иксодовые клещи – *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*. Случаи заболевания все чаще отмечаются на новых территориях, что свидетельствует о миграции вируса (Valarcher et al., 2015). Эффективным средством профилактики клещевого энцефалита, формирующим активный иммунитет, служит вакцинация (Билалова, 2009). Повышение мобильности людей, усиление миграционных процессов делают вакцинацию населения все более насущной задачей.

По мере накопления информации о механизмах развития иммунного ответа и его прогнозирования, а также о наличии потенциальных побочных эффектов становится актуальным дифференцированный подход к проведению профилактических вакцинаций, так называемая индивидуализация вакцинаций (Медуницын, 2004). Цель индивидуализации вакцинаций заключается в создании необходимой иммунной защиты организма при избегании излишней иммунизации, которая неоправдана с точки зрения целесообразности, экономики и медицинской этики. Один из подходов к индивидуализации вакцинации – подбор доз вакцины в зависимости от ее активности, стадии вакцинального процесса и ожидаемого уровня иммунного ответа вакцинируемого. Поэтому необходима разработка методов оценки потенциального уровня иммунологических реакций человека до проведения вакцинации.

Индивидуальная вариабельность выработки и длительного присутствия антител после вакцинации в значительной степени обусловлена наследственными особенностями клеточного и гуморального иммунитета, а также

типом вакцины, схемой вакцинации и другими средовыми факторами, например питанием (Poland et al., 2008). Гены, кодирующие белки иммунной системы и регуляторные области ДНК вблизи этих генов, содержат большое число однонуклеотидных полиморфных маркеров (ОНП) (Poland et al., 2011). Показано, что ОНП в генах главного комплекса гистосовместимости, а также в генах цитокинов и их рецепторов ассоциированы с иммунным ответом или его отсутствием у индивида в результате вакцинации (Linnik, Egli, 2016).

Белки семейства 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз (*OAS*) – важные факторы врожденного противовирусного иммунитета. У человека известно четыре гена, кодирующих белки этого семейства, – *OAS1*, *OAS2* и *OAS3*, расположенные кластером на участке q24 хромосомы 12, и *OASL*, локализованный на хромосоме 12. Белки *OAS1*, *OAS2* и *OAS3* присутствуют в клетке в мономерной форме. Появление двуцепочечной РНК вируса вызывает активацию ферментов, которые используют в качестве субстрата АТФ и катализируют полимеризацию АМФ с образованием 2'-5'-олигоаденилатов. Эти соединения взаимодействуют с латентной эндорибонуклеазой L, вызывая ее димеризацию и активацию, что приводит к деградации как клеточной, так и вирусной РНК, и, следовательно, к подавлению размножения вируса. Транскрипция мРНК генов семейства *OAS* индуцируется интерферонами (Hovanessian, Justesen, 2007; Kristiansen et al., 2011; Юдин и др., 2018).

Ранее при анализе 23 ОНП в генах *OAS1*, *OAS2*, *OAS3* и *OASL* было показано, что частоты генотипов, аллелей и/или гаплотипов по пяти SNP в генах *OAS2*: rs1293762 (интрон 2), rs15895 (3'-UTR), rs1732778 (3'-фланкирующий район) и *OAS3*: rs2285932 (экзон 6, Ile438Ile), rs2072136 (экзон 8, Ser567Ser) статистически достоверно различаются в группах больных тяжелыми формами клещевого энцефалита с поражением центральной нервной системы (менинго-энцефалитическая форма и др.) и больных с более легким течением заболевания, без поражения центральной нервной системы (лихорадочная, менингеальная формы), и/или с популяционным контролем (Barkhash et al., 2010). В генах семейства *OAS* ОНП ассоциированы с

чувствительностью к другим заболеваниям, вызываемым флавивирусами: лихорадке Западного Нила (Yakub et al., 2005; Lim et al., 2009; Bigham et al., 2011; Danial-Farran et al., 2015) и лихорадке денге (Alagarasu et al., 2013; Thamizhmani, Vijayachari, 2014), а также с ответом на противовирусную терапию интерфероном при гепатите С (Imran et al., 2014). I.H. Naralambieva с коллегами (2010) показали наличие ассоциаций 23 ОНП в кластере генов *OAS* с уровнем антител и секрецией ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 после вакцинации против краснухи.

Целью работы стал поиск возможных ассоциаций ОНП в генах *OAS2* и *OAS3*, для которых ранее была найдена ассоциация с развитием тяжелых форм клещевого энцефалита, с образованием антител и цитокинов после вакцинации против клещевого энцефалита.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 97 добровольцев (56 мужчин и 41 женщина) в возрасте от 15 до 30 лет (медиана 26 лет), ранее не вакцинированных против клещевого энцефалита и не имевших (по результатам анкетирования) контактов с клещами. Для иммунизации использовали вакцину «ЭнцеВир» против клещевого энцефалита (НПО «Микроген», Томск). Она представляла собой очищенную концентрированную стерильную суспензию инактивированного формалином и сорбированного на гидроксиде алюминия вируса клещевого энцефалита, полученного путем размножения во взвешенной культуре клеток куриных эмбрионов. Вакцину применяли по рекомендованной производителем схеме. Через один месяц после вакцинации брали пробы венозной крови. Планируемое исследование было одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Уровни специфических антител IgG против ВКЭ и интерлейкина 4 (ИЛ-4) анализировали методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «ВектоВКЭ-IgG-стрип» и «Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», р.п. Кольцово, Новосибирская область).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенолом (Sambrook, Russell, 2006). Генотипирование ОНП-локусов rs2285932, rs2072136, rs1293762, rs15895 и rs1732778 в генах 2'-5'-олигоденилатсинтетаз *OAS2* и *OAS3* осуществляли по методикам из (Barkhash et al., 2010). Проверку отклонения распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга проводили с помощью программы Hardy–Weinberg equilibrium calculator (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>).

Для определения нормальности распределения исследуемых признаков использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Поскольку признаки не подчинялись нормальному распределению, в сравниваемых группах вычисляли медиану 25 % и 75 % квартилей. Эффект пола оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Поскольку

пол не оказывал существенного влияния на исследуемые признаки, в дальнейших вычислениях его не учитывали. Эффект генотипа оценивали с помощью общей линейной модели. Зависимую переменную (уровень IgG антител) для статистического анализа подвергали логарифмической трансформации к нормальному распределению. Ранее при исследовании этой же выборки нами было показано достоверное влияние возраста на этот показатель (Лутова и др., 2016). Поэтому в модель вводили генотип как фиксированный фактор и возраст как ковариату. Парные сравнения выполняли путем *post hoc* анализа с использованием критерия Фишера. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0.05. Обработку результатов проводили с помощью пакета STATISTICA версии 8.0.

Результаты

Нами зафиксирован протективный иммунный ответ IgG против ВКЭ у 85.8 % женщин и 86.3 % мужчин (уровень IgG против ВКЭ > 100 МЕ/мл). Аналогичные результаты получены ранее другими исследователями при проведении вакцинопрофилактики клещевого энцефалита среди взрослого населения (Билалова, 2009). У всех обследуемых уровень ИЛ-4 (0.37–25.95 мг/мл) находился в допустимых пределах (ЗАО «Вектор-Бест», 2004), что свидетельствует о нормальном протекании процесса вакцинации.

ОНП в изученных генах были успешно генотипированы во всех 97 образцах, за исключением rs2072136, rs1293762 и rs15895, которые не выявлены в одном образце. Существенное отклонение распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга отсутствовало у всех ОНП, за исключением rs1732778 ($p < 0.05$). Частоты редких аллелей составляли: 0.309 для ОНП rs2285932 в гене *OAS3* (аллель Т); 0.313 для ОНП rs2072136 в гене *OAS3* (аллель А); 0.411 для ОНП rs1293762 в гене *OAS2* (аллель Т); 0.302 для ОНП rs15895 в гене *OAS2* (аллель А) и 0.361 для ОНП rs1732778 в гене *OAS2* (аллель А). Эти частоты соответствуют выявленным ранее частотам рассматриваемых аллелей в популяции жителей г. Новосибирска: 0.251, 0.294, 0.420, 0.281 и 0.273 соответственно (Barkhash et al., 2010).

Результаты анализа ассоциации ОНП в генах 2'-5'-олигоденилатсинтетаз с уровнем IgG против ВКЭ и ИЛ-4 представлены в таблице. Выработка антител в ответ на введение вакцины была достоверно ассоциирована с ОНП rs1732778 в регуляторном районе гена *OAS2* ($p < 0.05$). Этот показатель у людей с гетерозиготным генотипом G/A оказался существенно выше, чем у пациентов с гомозиготными генотипами G/G и A/A ($p < 0.01$). Индивиды-носители аллеля А в составе генотипов G/A и A/A этого же ОНП имели сниженный уровень ИЛ-4 по сравнению с гомозиготными индивидами G/G ($p < 0.004$). Причем эти различия сохранялись после введения поправки Бонферрони на множественные сравнения. ОНП rs15895 оказался ассоциированным с титрами ИЛ-4 на уровне тенденции ($p < 0.06$). Тем не менее при попарном сравнении индивиды с гомозиготным генотипом A/A имели достоверно сниженный уровень ИЛ-4 по отношению к носителям аллеля G ($p < 0.04$).

Ассоциация ОНП в генах 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз с уровнем IgG против ВКЭ (МЕ/мл) и ИЛ-4 (пг/мл) после вакцинации против клещевого энцефалита

Ген	Позиция	Район	ОНП	Генотип	Медиана*	25–75 % квантили	p**
IgG							
OAS3	112 949 145	Экзон 6, p.Ile438Ile	rs2285932	C/C (n = 44)	221.5	156.0–260.0	0.846
				C/T (n = 46)	219.0	101.0–260.0	
				T/T (n = 7)	210.0	81.0–260.0	
OAS3	112 961 114	Экзон 8, p.Ser567Ser	rs2072136	G/G (n = 43)	210.0	121.0–260.0	0.988
				G/A (n = 46)	227.5	101.0–260.0	
				A/A (n = 7)	216.0	39.0–260.0	
OAS2	112 993 031	Интрон 2	rs1293762	G/G (n = 35)	191.0	71.0–245.0	0.412
				G/T (n = 43)	237.0	145.0–260.0	
				T/T (n = 18)	199.0	94.0–238.0	
OAS2	113 010 483	Экзон 10, p.Ter720Trp	rs15895	G/G (n = 48)	198.0	110.5–255.0	0.859
				G/A (n = 38)	236.0	101.0–260.0	
				A/A (n = 10)	199.0	136.0–243.0	
OAS2	113 019 120	3'-область, 7 397 п. н.	rs1732778	G/G (n = 35)	191.0 ^a	90.0–260.0	0.047
				G/A (n = 54)	235.5 ^b	169.0–260.0	
				A/A (n = 8)	112.0 ^a	31.0–201.0	
ИЛ-4							
OAS3	112 949 145	Экзон 6, p.Ile438Ile	rs2285932	C/C (n = 40)	9.89	4.47–15.65	0.835
				C/T (n = 40)	10.06	5.36–15.21	
				T/T (n = 5)	7.76	5.83–12.58	
OAS3	112 961 114	Экзон 8, p.Ser567Ser	rs2072136	G/G (n = 37)	11.16	6.04–15.78	0.605
				G/A (n = 40)	8.31	4.35–14.84	
				A/A (n = 7)	10.0	4.56–14.28	
OAS2	112 993 031	Интрон 2	rs1293762	G/G (n = 32)	9.21	5.83–15.21	0.926
				G/T (n = 38)	10.52	4.39–14.40	
				T/T (n = 14)	8.04	4.82–16.67	
OAS2	113 010 483	Экзон 10, p.Ter720Trp	rs15895	G/G (n = 43)	8.42 ^a	4.39–14.28	0.061
				G/A (n = 33)	13.67 ^a	8.09–16.67	
				A/A n = 8)	6.80 ^b	4.69–9.39	
OAS2	113 019 120	3'-область, 7 397 п. н.	rs1732778	G/G (n = 25)	14.40 ^a	7.76–16.80	0.004
				G/A (n = 53)	8.42 ^b	4.56–12.46	
				A/A (n = 7)	4.56 ^b	3.36–12.58	

* Одинаковые буквы в надстрочных индексах показывают отсутствие достоверных различий величин медиан для разных генотипов по результатам post hoc теста Фишера.
** Достоверность влияния генотипов ОНП по результатам оценки с помощью общей линейной модели.

Обсуждение

Иммунный ответ на вакцину определяется множеством факторов, в том числе генетическими особенностями индивида. Идентификация генетических маркеров, которые регулируют развитие иммунного ответа, необходима для разработки индивидуального подхода к проведению профилактических вакцинаций (Медуницын, 2004). Установлено, что выработка специфических антител после введения вакцины в значительной степени контролируется генами, кодирующими белки главного комплекса

гистосовместимости, генами цитокинов и их рецепторов, генами Toll-подобных рецепторов и другими (Linnik, Egli, 2016). Однако генетические факторы, которые опосредуют иммунный ответ при вакцинации против инфекций, вызываемых флавивирусами, остаются практически неизученными. Имеется лишь одно сообщение о возникновении висцеротропной болезни у 64-летнего пациента с мутациями в генах хемокинового рецептора *CCR5* и его лиганда *RANTES* после введения ему аттенуированной вакцины против желтой лихорадки (Pulendran et al.,

2008). Раньше на использованной в нашей работе выборке была показана перспективность применения делеции в гене *CCR5* в качестве потенциального маркера успешной вакцинации против клещевого энцефалита в популяции русских Западной Сибири (Лутова и др., 2016).

В настоящей работе у русских жителей Новосибирска исследовали полиморфизм в пяти ОНП генов *OAS2* и *OAS*, для которых ранее на этой же популяции была найдена ассоциация с развитием тяжелых форм клещевого энцефалита (Barkhash et al., 2010). Насколько нам известно, это первая работа по изучению влияния ОНП-локусов в генах 2'-5'-олигоаденилатсинтез на выработку специфических антител после вакцинации против клещевого энцефалита. Для исключения возможного влияния посторонних генетических и средовых факторов выборку формировали преимущественно из молодых людей русской национальности, которые не подвергались укусам клещей или вакцинации против клещевого энцефалита, но длительно проживали в эндемичном по клещевому энцефалиту районе.

Частоты редких аллелей изученных ОНП в нашем исследовании соответствуют выявленным ранее частотам этих аллелей у русских жителей г. Новосибирска (Barkhash et al., 2010). Достоверное отклонение распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга наблюдали только для ОНП rs1732778 в гене *OAS2*. Другие исследователи также выявили отклонение распределения генотипов от равновесия Харди–Вайнберга для ОНП rs1732778, rs2285932 и rs2072136 в выборках русских жителей г. Новосибирска, которые болели различными формами клещевого энцефалита (Barkhash et al., 2010). Поэтому причина отклонения распределения генотипов ОНП rs1732778 от равновесия Харди–Вайнберга в нашем исследовании, возможно, связана не с ошибками генотипирования, а с отсутствием панмиксии в исследованной популяции, хотя нельзя исключить также популяционную стратификацию и влияние отбора. Интересно, что при изучении семи этнических групп Северной Евразии наименьшие частоты генотипа G/G ОНП rs2072136 гена *OAS3*, ассоциированного с предрасположенностью к развитию тяжелых форм клещевого энцефалита, были выявлены у алтайцев, хакасов, тувинцев и шорцев, вероятно, интенсивно контактирующих с клещами в местах проживания (Бархаш и др., 2010). Авторы высказали предположение, что вирус клещевого энцефалита мог служить фактором отбора определенных вариантов генов *OAS* у центральноазиатских монголоидов.

Мы обнаружили ассоциацию ОНП rs1732778 в гене *OAS2* с уровнем IgG против ВКЭ после вакцинации от клещевого энцефалита (см. таблицу). Уровень антител у индивидов с гетерозиготным генотипом G/A был достоверно выше, чем у людей с гомозиготными генотипами G/G и A/A. Эффект превосходства гетерозигот над гомозиготами наблюдается довольно часто. Например, реакция клеточного иммунитета на коклюшный токсин и филаментозный гемагглютинин у субъектов с генотипом A/G ОНП rs1800896 в промоторе гена *IL-10* была достоверно выше, чем у субъектов с генотипами G/G и A/A (Gröndahl-Yli-Hannuksela et al., 2016). В литературе нами найдена лишь одна работа, посвященная изучению роли

генов *OAS* в регуляции иммунного ответа после вакцинации. И.Н. Haralambieva с коллегами (2010) показали, что минорные аллели исследованного нами ОНП rs1732778 и ОНП rs2464288 в гене *OAS2* связаны с повышенным уровнем специфических антител после иммунизации против краснухи. ОНП rs1732778 ассоциирован с чувствительностью к вызываемым флавивирусами заболеваниями – клещевому энцефалиту (Barkhash et al., 2010) и лихорадке денге (Alagarasu et al., 2013; Thamizhmani, Vijayachari, 2014). Следует отметить, что ОНП rs1732778 находится на расстоянии 7397 п. н. от 3'-конца гена *OAS2* (UCSC Genome Browser Gateway, 2017). Не исключено, что непосредственное влияние на признак оказывает не этот ОНП, а другой, который находится с ним в неравновесии по сцеплению. На участке ± 250 тыс. п. н. в окрестностях ОНП rs1732778 на хромосоме 12 локализовано 11 генов (*RPH3A*, *OAS1*, *OAS3*, *OAS2*, *DTX1*, *RASAL1*, *CFAP73*, *DOX54*, *RITA1*, *IQCD*, *TPCN1*). Однако только 3 гена из этих 11, а именно гены 2'-5'-олигоаденилатсинтез (*OAS1*, *OAS2*, *OAS3*), участвуют в контроле иммунного ответа.

Наше исследование показывает, что ОНП rs1732778 в гене *OAS2* достоверно ассоциирован с уровнем ИЛ-4 после вакцинации против клещевого энцефалита. Этот результат усиливается тем, что ОНП rs15895, локализованный в экзоне 10 гена *OAS2* на расстоянии 8637 п. н. от ОНП rs1732778, также оказался ассоциированным с уровнем ИЛ-4 на уровне тенденции (см. таблицу). ИЛ-4 является важным регуляторным цитокином, который продуцируется тучными клетками, Th2-лимфоцитами, эозинофилами и базофилами (Gadani et al., 2012). ИЛ-4 влияет на активацию клеточного иммунитета Th2-типа (Zamorano et al., 2003), продукцию и секрецию IgE В-лимфоцитами (Geha et al., 2003) и альтернативную активацию макрофагов, которая отличается от классической провоспалительной активации (Gordon, 2003). Вследствие чрезвычайно низкого уровня ИЛ-4 после вакцинации против краснухи другие исследователи не выявили каких-либо ассоциаций ОНП в кластере генов *OAS* (Haralambieva et al., 2010). Роль ИЛ-4 в формировании гуморального иммунного ответа при вакцинации против клещевого энцефалита в настоящее время не ясна. Можно предположить, что врожденный противовирусный иммунитет, который регулируется генами семейства *OAS*, вовлечен в контроль премирования лимфоцитов и, следовательно, модулирует структуру и амплитуду специфического (приобретенного) иммунного ответа на инактивированную вирусную вакцину.

В пользу такого предположения говорят результаты нескольких исследований. Из всего семейства генов *OAS* у человека *OAS2* имеет самый высокий уровень индукции интерферонами (Sanda et al., 2006). С использованием методов протеомики было показано существование физического взаимодействия между белками *OAS2* и *NOD2* в линии клеток человека THP-1 (Dugan et al., 2009). Белок *NOD2* принадлежит к семейству Nod1/Apaf-1, экспрессируется в лейкоцитах периферической крови и играет важную роль в иммунном ответе на бактериальные липополисахариды, связываясь с бактериальным мурамилдипептидом и активируя белок NFkB (Ogura et al., 2001). По-видимому, этот белок может участвовать также в фор-

мировании врожденного противовирусного иммунитета. Известно, что другой белок семейства NOD-подобных рецепторов – NLRP3 – способен взаимодействовать с вирусом гриппа типа А (Allen et al., 2009).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ОНП в регуляторной области гена *OAS2* (rs1732778) ассоциирован с образованием противовирусных антител IgG и уровнем ИЛ-4 после вакцинации против клещевого энцефалита. По-видимому, генетический полиморфизм в гене *OAS2* следует принимать во внимание при индивидуализации вакцинопрофилактики этого заболевания. Однако, ввиду ограниченного размера выборки, полученные нами результаты следует интерпретировать с осторожностью. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этих ассоциаций в независимых популяционных выборках, а также анализ механизмов, посредством которых генетические варианты в генах 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз могут влиять на иммунный ответ после вакцинации против заболеваний, вызываемых флавивирусами.

Благодарности

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00127).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

Бархаш А.В., Бабенко В.Н., Кобзев В.Ф., Ромашенко А.Г., Воевода М.И. Полиморфизм генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз (OAS) человека, связанный с предрасположенностью к тяжелым формам клещевого энцефалита, в популяциях Северной Евразии. Молекуляр. биология. 2010;44:985-993. [Barkhash A.V., Babenko V.N., Kobzev V.F., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. Polymorphism in the human 2'-5'-oligoadenylate synthetase genes (OAS), associated with predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis, in populations from North Eurasia. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology (Moscow)*. 2010;44:985-993. (in Russian)]

Билалова Г.П. Вопросы практического применения вакцины «Энцеви́р». Сиб. мед. журн. 2009;2:86-91. [Bilalova G.P. Issues of the practical use of Encevir vaccine. *Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2009;2:86-91. (in Russian)]

ЗАО «Вектор-Бест». Реагенты для определения цитокинов. 2004. Доступно на <http://www.cytokines.ru/2004/4/Art12.php>. [Vector-Best Company. Reagents for cytokine analysis. 2004. Available at <http://www.cytokines.ru/2004/4/Art12.php>. (in Russian)]

Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит: руководство для врачей. Новосибирск: Гос. мед. академия МЗ РФ, 2001. [Ierusalimsky A.P. Tick-Borne Encephalitis: Manual for Physicians. Novosibirsk: State Medical Academy Publ., 2001. (in Russian)]

Лутова С.Л., Туманов Ю.В., Воевода М.И., Белявская В.А. Вакциномика клещевого вирусного энцефалита: оценка влияния генетических и физиологических факторов реактивности макроорганизма на функциональную активность специфических антител: Сб. статей науч.-практ. конф. Новосибирск, 2016;191-193. [Lutova S.L., Tumanov Yu.V., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A. Tick-borne encephalitis and vaccines: genetic and physiological factors influencing the functional activity of specific antibodies. *Proceedings of the Scientific and Practical Conference*. Novosibirsk, 2016;191-193. (in Russian)]

Медунинцын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х, 2004. [Medunintsin N.V. Vaccinology. Moscow: Triada-X Publ., 2004. (in Russian)]

Юдин Н.С., Бархаш А.В., Максимов В.Н., Игнатъева Е.В., Ромашенко А.Г. Генетическая предрасположенность человека к заболеваниям, вызываемым вирусами семейства Flaviviridae. Молекуляр. биология. 2018;52(2):190-209. [Yudin N.S., Barkhash A.V., Maksimov V.N., Ignatieva E.V., Romaschenko A.G. Human genetic predisposition to diseases caused by viruses from Flaviviridae family. *Molecular Biology (Moscow)*. 2018;52:165-181.]

Alagarasu K., Honap T., Damle I.M., Mulay A.P., Shah P.S., Cecilia D. Polymorphisms in the oligoadenylate synthetase gene cluster and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Infect. Genet. Evol.* 2013;14:390-395. DOI 10.1016/j.meegid.2012.12.021.

Allen I.C., Scull M.A., Moore C.B., Holl E.K., McElvania-TeKippe E., Taxman D.J., Guthrie E.H., Pickles R.J., Ting J.P. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009;30:556-565.

Barkhash A.V., Perelygin A.A., Babenko V.N., Myasnikova N.G., Pilipenko P.I., Romaschenko A.G., Voevoda M.I., Brinton M.A. Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease. *J. Infect. Dis.* 2010;202(12):1813-1818. DOI 10.1086/657418.

Bigham A.W., Buckingham K.J., Husain S., Emond M.J., Boffending K.M., Gildersleeve H., Rutherford A., Astakhova N.M., Perelygin A.A., Busch M.P., Murray K.O., Sejvar J.J., Green S., Kriesel J., Brinton M.A., Bamshad M. Host genetic risk factors for West Nile virus infection and disease progression. *PLoS One*. 2011;6(9):e24745. DOI 10.1371/journal.pone.0024745.

Danial-Farran N., Eghbaria S., Schwartz N., Kra-Oz Z., Bisharat N. Genetic variants associated with susceptibility of Ashkenazi Jews to West Nile virus infection. *Epidemiol. Infect.* 2015;143:857-863. DOI 10.1017/S0950268814001290.

Dugan J.W., Albor A., David L., Fowlkes J., Blackledge M.T., Martin T.M., Planck S.R., Rosenzweig H.L., Rosenbaum J.T., Davey M.P. Nucleotide oligomerization domain-2 interacts with 2'-5'-oligoadenylate synthetase type 2 and enhances RNase-L function in THP-1 cells. *Mol. Immunol.* 2009;47(2-3):560-566. DOI 10.1016/j.molimm.2009.09.025. Epub 2009 Oct 23.

Gadani S.P., Cronk J.C., Norris G.T., Kipnis J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J. Immunol.* 2012;189:4213-4219. DOI 10.4049/jimmunol.1202246.

Geha R.S., Jabara H.H., Brodeur S.R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:721-732.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:23-35.

Gröndahl-Yli-Hannuksela K., Vahlberg T., Ilonen J., Mertsola J., He Q. Polymorphism of IL-10 gene promoter region: association with T cell proliferative responses after acellular pertussis vaccination in adults. *Immunogenetics*. 2016;68:733-741. DOI 10.1007/s00251-016-0923-0.

Haralambieva I.H., Dhiman N., Ovsyannikova I.G., Vierkant R.A., Pankrat V.S., Jacobson R.M., Poland G.A. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase single-nucleotide polymorphisms and haplotypes are associated with variations in immune responses to rubella vaccine. *Hum. Immunol.* 2010;71:383-391. DOI 10.1016/j.humimm.2010.01.004.

Hovanessian A.G., Justesen J. The human 2'-5'-oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie*. 2007;89:779-788.

Imran M., Manzoor S., Khattak N.M., Tariq M., Khalid M., Javed F., Bhatti S. Correlation of OAS1 gene polymorphism at exon 7 splice acceptor site with interferon-based therapy of HCV infection in Pakistan. *Viral Immunol.* 2014;27:105-111. DOI 10.1089/vim.2013.0107.

Kristiansen H., Gad H.H., Eskildsen-Larsen S., Despres P., Hartmann R. The oligoadenylate synthetase family: an ancient protein family with multiple antiviral activities. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011;31:41-47. DOI 10.1089/jir.2010.0107.

- Lim J.K., Lisco A., McDermott D.H., Huynh L., Ward J.M., Johnson B., Johnson H., Pape J., Foster G.A., Krysztof D., Follmann D., Stramer S.L., Margolis L.B., Murphy P.M. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000321. DOI 10.1371/journal.ppat.1000321.
- Linnik J.E., Egli A. Impact of host genetic polymorphisms on vaccine induced antibody response. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016;12:907-915. DOI 10.1080/21645515.2015.1119345.
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 2001;276:4812-4818. DOI 10.1074/jbc.M008072200.
- Poland G.A., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G. Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery? *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002344.
- Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M. Vaccine immunogenetics: bedside to bench to population. *Vaccine.* 2008;26:6183-6188.
- Pulendran B., Miller J., Querec T.D., Akondy R., Moseley N., Laur O., Glidewell J., Monson N., Zhu T., Zhu H., Staprans S., Lee D., Brinton M.A., Perelygin A.A., Vellozzi C., Brachman P. Jr., Lalor S., Teuwen D., Eidex R.B., Cetron M., Priddy F., del Rio C., Altman J., Ahmed R. Case of yellow fever vaccine – associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J. Infect. Dis.* 2008;198:500-507. DOI 10.1086/590187.
- Sambrook J., Russell D.W. The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- Sanda C., Weitzel P., Tsukahara T., Schaley J., Edenberg H.J., Stephens M.A., McClintick J.N., Blatt L.M., Li L., Brodsky L., Taylor M.W. Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. *J. Interferon Cytokine Res.* 2006;26:462-472.
- Thamizhmani R., Vijayachari P. Association of dengue virus infection susceptibility with polymorphisms of 2'-5'-oligoadenylatesynthetase genes: a case-control study. *Braz. J. Infect. Dis.* 2014;18:548-550.
- UCSC Genome Browser Gateway. 2017. Available at http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgscid=225788287_h9nI4Rnx-WsBd3VHZFA16jALan0UJ.
- Valarcher J.F., Hägglund S., Juremalm M., Blomqvist G., Renström L., Zohari S., Leijon M., Chirico J. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech.* 2015;34:453-466.
- Yakub I., Lillibridge K.M., Moran A., Gonzalez O.Y., Belmont J., Gibbs R.A., Tweardy D.J. Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylatesynthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. *J. Infect. Dis.* 2005;192:1741-1748.
- Zamorano J., Rivas M.D., Pérez M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Immunologia.* 2003;22:215-224.

Межлинейные различия по эмоциональным и весовым параметрам у крыс с кататоническим типом реагирования и крыс Вистар

Т.А. Алехина , Р.В. Кожемякина

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

При отборе животных по поведению наблюдаются прямой селективный эффект и изменения в неспецифических стрессорных функциях. В селекционируемой линии появляются новые поведенческие формы, отличающиеся от отбираемых форм по селекционному критерию. В линии ГК (генетическая кататония) в большом количестве стали рождаться «нервные» крысы. Селекционный критерий предполагает отбор по признаку длительного каталептического застывания, однако «нервные» особи характеризуются повышенным уровнем моторной возбудимости: побежками, прыжками и вокализацией. Основной целью настоящей работы было определение фенотипических параметров у крыс линии ГК и выделение главных компонент изменчивости по эмоциональным и весовым показателям. Контролем служили крысы из исходной популяции Вистар. Измеряли время каталептического застывания, уровень возбудимости животных, артериальное давление, акустический рефлекс вздрагивания, судорожную активность, массу сердца, почек, надпочечников, селезенки. Применяли методы многомерного анализа: факторный анализ и метод главных компонент. В исследуемом поколении крыс ГК подтверждена склонность к застыванию в спокойной обстановке и после действия сильного аудиогенного раздражителя, отмечены более интенсивные реакции вздрагивания, умеренная гипертензия, более высокий относительный вес сердца и надпочечников. Выделены две основные компоненты изменчивости: амплитуда вздрагивания (PC1) и морфофункциональная изменчивость (PC2). Определено различное расположение точек у особей Вистар и ГК в координатах первых главных компонент. Получено подтверждение генетического единства реакций застывания и «нервности» с помощью метода главных компонент. Показано, что в PC2 абсолютные показатели массы сердца, почек, надпочечников и селезенки вносят отрицательный вклад при положительных значениях таких показателей, как застывание и «нервность». В этой же компоненте отмечено усиление реакций застывания и «нервности» при положительной корреляции с относительной массой сердца и надпочечников. Обсуждаются различия по знакам вкладов во вторую компоненту морфофункциональной изменчивости.

Ключевые слова: модель кататонии; селекция; рефлекс вздрагивания; артериальное давление; эпилепсия; вес органов; многомерный анализ.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Алехина Т.А., Кожемякина Р.В. Межлинейные различия по эмоциональным и весовым параметрам у крыс с кататоническим типом реагирования и крыс Вистар. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):452-458. DOI 10.18699/VJ18.382

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Alekhina T.A., Kozhemjakina R.V. Interstrain differences in emotional and weight indices in GC rats with catatonic response and Wistar rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):452-458. DOI 10.18699/VJ18.382 (in Russian)

УДК 616.895:159.944.4

Поступила в редакцию 10.03.2017

Принята к публикации 12.03.2018

© АВТОРЫ, 2018

 e-mail: alek@bionet.nsc.ru

Interstrain differences in emotional and weight indices in GC rats with catatonic response and Wistar rats

T.A. Alekhina , R.V. Kozhemjakina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In selecting rats for behavior, we observe a direct natural effect and affect the nonspecific stress function. In this process, new behavioral phenotypes appear in the strain under selection. They differ from the selected forms in the selection criterion. In the GC strain, a large proportion of the so-called nervous rats emerge. The criterion presumes the selection for the long cataleptic freezing character, whereas the nervous rats display elevated motor excitement: running, jumping, and vocalization. The main purpose of our study was to assess phenotypic indices in GC rats (abbreviated from genetic and catatonia) and recognize principal components of variability for emotional and weight indices. Rats of the ancestral Wistar population were taken as control. The following indices were measured: time of cataleptic freezing, excitement level, blood pressure, acoustic startle response, seizure activity, and weights of the heart, kidneys, adrenals, and spleen. Multivariate analysis methods were applied: factor analysis and principal component analysis. We confirmed the inclination of GC rats of the generation studied to freezing in quiet surrounding and after a strong acoustic stimulus. More pronounced startle responses, moderate hypertension, and larger weights of the heart and adrenals were noted. Two principal variability components were recognized: startle amplitude (PC1) and morphofunctional variability (PC2). The figure shows different locations of Wistar and GC individuals in principal component coordinates. The principal component method confirmed the genetic relationship between the startle and nervousness responses. It was shown that in PC2 the indices of heart, kidney, adrenal, and spleen weight exert negative effects, whereas the effects of startle and nervousness were positive. In the same component, an increase in the startle and nervousness responses positively correlates with the relative weights of the heart and adrenals. Differences in the directions of the contributions to the second component of morphofunctional variability are discussed.

Key words: model of catatonia; selection; startle-reflex; arterial pressure; epilepsy; organ weights; multidimensional analysis.

При отборе животных по сложным признакам участвуют регуляторные системы организма, что отражается на изменении поведения особей селекционируемых линий (Беляев, 1962; Беляев, Бородин, 1982). Так, оказалось, что в ходе селекции на сохранение неподвижной позы (катаlepsии) у крыс линии ГК (от слов «генетическая» и «катаlepsия») стали появляться высоко возбудимые («нервные») животные, которых в англоязычной литературе называют jerky – с рывковыми движениями и jumping – прыгающие (Javelot et al., 2011; Himmler et al., 2013). Начиная с 40-го поколения селекции линии ГК доля таких животных к 70-му поколению селекции увеличилась до 62 % (рис. 1). Появление нового признака ассоциировано с гормональными изменениями. В первом поколении селекции крысы ГК не отличались от исходной популяции Вистар по уровню кортикостерона – одного из основных маркеров стрессорной реактивности. В 17-м поколении уровень этого гормона при стрессе был снижен (Шульга и др., 1996); в 45-м он снизился в состоянии покоя (Амтиславский и др., 2000); в 65-м поколении в спокойном состоянии он повысился более чем в два раза по сравнению с исходной популяцией Вистар (Алехина и др., 2016). При этом шло нарастание доли животных с «нервными» реакциями в линии ГК (Чугуй и др., 2007), в последнем, 76-м, поколении селекции у 90 % крыс линии ГК наблюдалась «нервность».

«Нервные» реакции в каталептической линии выражаются в повышенной пугливости, вокализации, пароксизмальных побегках (Чугуй и др., 2007), «раздражительной агрессивности» (Nikulina et al., 1987), более интенсивных реакциях вздрагивания (Попова и др., 1999), агрессии страха (Алехина и др., 2016). К сопутствующим признакам можно отнести умеренную гипертонию, расстройство сна (Оганесян и др., 1990), нарушение эстральной цикличности (Клочков и др., 2011), дисбаланс стероидных гормонов (Шульга и др., 1996).

Известно, что отбор крыс по эмоциональным параметрам – уровням тревожности (линии HAB-LAB), дефекации (линии MR-MNR), обучаемости условной реакции активного избегания (линии RHA-RLA), фоновому уровню артериального давления (линии SHR-WKY), артериального давления при эмоциональном стрессе (линии НИСАГ-WAG) – ассоциирован с разными гормональными профилями. В состоянии стресса происходит активация системы гипоталамус–гипофиз–надпочечники (ГГНС) путем усиления секреции кортикотропин-релизинг-гормона, через него – секреции АКТГ и стимуляции синтеза кортикостерона. Показана стимуляция двух последних звеньев ГГНС в линиях HAB vs LAB (по уровням АКТГ и кортикостерона) (Salome et al., 2006), в MR vs MNR (по уровню АКТГ) (Kosti et al., 2006), в SHR vs Wistar (по уровню кортикостерона) (Roman et al., 2004) и у ГК vs Вистар (по уровню кортикостерона) (Алехина и др., 2016). В линиях RHA/Verh vs RLA/Verh (Ferré et al., 1995) и НИСАГ vs Вистар (Maslova et al., 1998) обнаружено снижение содержания стресс-зависимого гормона при развитии стресса. Наряду с этим у интактных животных указанных линий после нескольких десятков поколений отбора были обнаружены различия в весе сердца, почек, надпочечников, селезенки и тимуса (Hlavacova et al.,

2006; Redina et al., 2006; Salome et al., 2006; Редина и др., 2014). Выявление различий между селекционируемой и исходной линиями по стресс-зависимым параметрам может быть использовано как один из подходов к изучению физиологических механизмов эмоциональной реактивности у особей этих двух моделей (Ramos, Mormede, 1998).

Основной задачей настоящего исследования было проанализировать различия между параметрами эмоциональной реактивности животных (по параметрам катаlepsического застывания, реакциям «нервности», вздрагивания, артериального давления, на сильный акустический сигнал) и массой внутренних органов при помощи многомерного анализа у крыс линии ГК 77-го поколения селекции и у крыс из исходной популяции Вистар.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Исследования выполнены на крысах-самцах линий Вистар ($n = 8$) и ГК ($n = 10$) 77-го поколения селекции. Крысы обеих линий родились в июле 2015 г. (с разбросом по датам рождения в 10 дней) и были включены в опыт в четырехмесячном возрасте. Животных содержали в виварии ФИЦ ИЦиГ СО РАН при свободном доступе к воде и корму. Все процедуры на крысах проведены в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН и Европейского парламента и Совета Европейского Союза (директива 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года).

Тест на застывание (катаlepsию). Животных рассаживали по одному в клетку и через сутки начинали тестирование. Осторожно, без резких движений, помещали крысу в угол клетки, с помощью тестера приподнимали ее за морду в вертикальную стойку и измеряли время пассивного сохранения крысой этой насильственно приданной ей позы. Предрасположенными к катаlepsии считали тех животных, которые застывали дольше 10 с. Тестирование проводилось не менее трех раз в неделю. Когда крысы ГК стали проявлять «нервные» реакции, регистрировали время застывания у них при проведении тестером по прутьям клетки. У одной и той же крысы одновременно фиксировали и время застывания, и «нервные» реакции.

Тест на «нервность». Наряду с тестированием на застывание оценивали «нервную» реакцию. Если животное при касании тестера вздрагивает или совершает побегки и мечется по клетке, то присваивали 1 балл; если крыса спокойно реагирует на тестер, обнюхивает или грызет его, то ставили 0 баллов.

Тестирование аудиогенной эпилепсии. Использовали камеру из оргстекла с пластиковым полом размером 50 × 50 × 50 см и закрепленным с внутренней стороны электрическим звонком (сила звука – 110 дБ, частота – 60 Гц). Время тестирования с включенным звуком – в пределах 1 мин. Оценку реакции производили по балльной системе: 0 – отсутствие двигательного возбуждения; 1 – беспорядочные прыжки и бег; 2 – двухволновый припадок; 3–4 – клонико-тонические судороги. Измеряли время постиклонной катаlepsии в секундах. Использовали видеокамеру Panasonic HDC-SD40.

Реакции в Startle-боксе. Акустический рефлекс вздрагивания исследовали в аппарате Startle Response (TSE Equipment). Аппарат представляет собой звукопрони-

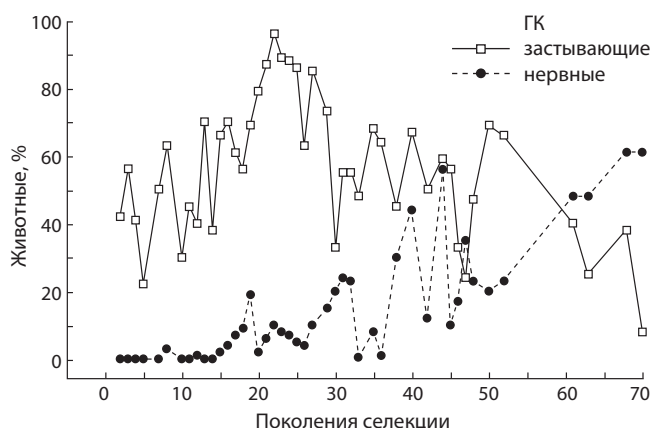


Рис. 1. Соотношение «застывающих» и «нервных» крыс в ходе селекции линии ГК.

цаемый бокс с чувствительной платформой, на которую помещается рестрикционная клетка. Период адаптации длился 3 мин (белый шум, 65 дБ). Затем давали 10 звуковых сигналов (белый шум 40 мс, 115 дБ). Длительность интервалов между сигналами – 15 с. Колебание платфор-

мы регистрировалось автоматически, цифровые величины силы давления на платформу переносились на компьютер. Амплитуду вздрагивания определяли как максимальное давление на платформу, деленное на массу тела животного. Показатель «привыкания старт-реакции» вычисляли как разницу между (амплитудой вздрагивания-1 минус амплитуду вздрагивания-10), деленную на амплитуду вздрагивания-1.

Измерение артериального давления (АД) выполняли сфигмографическим методом, при котором регистрируются колебания сосудистой стенки артерии хвоста (Pfeffer et al., 1971) под эфирным наркозом. Спустя неделю после измерения АД в покое определяли АД в узких трубках без наркоза (стресс при ограничении подвижности) через 15 и 30 мин.

Вес органов. Декапитацию проводили при помощи гильотины в состоянии эфирного наркоза, измеряли массу сердца, почек и надпочечников на электронных весах (серии SK/SK-D/SK-WP).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Различия по поведенческим и физиологическим параметрам (реакции застывания, «нервности», амплитуда вздрагивания, артери-

Таблица 1. Фенотипические параметры у крыс Вистар и ГК

Параметр	Вистар (n = 8)	ГК (n = 10)	Достоверность (LSD-критерий)
Застывание, с	1.13 ± 0.74	8.2 ± 2.9	p < 0.05
Нервность, балл	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	p > 0.05
Вздрагивание-1/масса тела	1.83 ± 0.34	1.91 ± 0.41*	»
Вздрагивание-2/масса тела	1.56 ± 0.26	1.96 ± 0.36*	»
Вздрагивание-3/масса тела	1.39 ± 0.23	2.01 ± 0.42*	»
Вздрагивание-4/масса тела	1.12 ± 0.21	1.62 ± 0.38*	»
Вздрагивание-5/масса тела	1.16 ± 0.22	1.73 ± 0.39*	»
Вздрагивание-6/масса тела	1.14 ± 0.26	1.74 ± 0.41*	»
Вздрагивание-7/масса тела	1.36 ± 0.36	1.71 ± 0.38*	»
Вздрагивание-8/масса тела	1.43 ± 0.30	1.72 ± 0.32*	»
Вздрагивание-9/масса тела	1.38 ± 0.33	1.92 ± 0.46*	»
Вздрагивание-10/масса тела	1.53 ± 0.36	1.83 ± 0.49*	»
АД под наркозом, мм рт. ст.	128.6 ± 4.8	139.2 ± 3.4	p = 0.08
АД через 15 мин, мм рт. ст.	146.9 ± 3.6	160.9 ± 5.3	p = 0.05
АД через 30 мин, мм рт. ст.	155.0 ± 5.1	176 ± 5.7	p < 0.02
Аудиогенные припадки, балл	0.38 ± 0.38	0.50 ± 0.27	p > 0.05
Постиктальная катаlepsия, с	113.4 ± 35.8	251.5 ± 32.6	p = 0.01
Масса тела, г	460.9 ± 12.1	300.9 ± 8.4	p = 0.000
Масса сердца, г	1.54 ± 0.06	1.15 ± 0.04	»
Масса почек, г	3.45 ± 0.09	2.23 ± 0.04	»
Масса надпочечников, мг	68.1 ± 3.1	58.3 ± 2.31	p < 0.05
Масса селезенки, г	1.31 ± 0.04	0.93 ± 0.04	p = 0.000
Сердце/масса тела (×10 ⁻³)	3.3 ± 0.1	3.8 ± 0.1	p > 0.05
Почки/масса тела (×10 ⁻³)	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.1	»
Надпочечники/масса тела (×10 ⁻³)	0.148 ± 0.01	0.195 ± 0.01	p = 0.001
Селезенка/масса тела (×10 ⁻³)	2.85 ± 0.10	3.09 ± 0.09	p > 0.05

* F(1, 160) = 6.6; p = 0.01, n – число животных.

альное давление, припадки, длительность каталепсии, масса внутренних органов) оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа в программе ANOVA по LSD-критерию. Достоверность изменений направления реакций по акустическому рефлексу вздрагивания определяли по двухфакторному дисперсионному анализу. Идентификацию основных факторов изменчивости фенотипических параметров проводили при помощи метода главных компонент (PCA).

Результаты

Тест на застывание. Время сохранения неподвижной позы у крыс ГК было в три раза выше, чем у крыс Вистар ($p < 0.05$) (табл. 1). Однако время застывания крыс ГК не достигало выбранного ранее критерия – 10 с. Иными словами, в линии ГК доминирующей реакцией в тесте стало «нервное» реагирование, а доля «застывающих» крыс снизилась до 10 % (см. рис. 1).

Тест на «нервность». Крысы Вистар реагировали на тестер спокойно, и каждой из них было присвоено 0 баллов. Крысы ГК, напротив, проявляли пугливость, каждой из них было присвоено по 1 баллу (см. табл. 1).

Тестирование аудиогенной эпилепсии. Не было обнаружено различий по числу припадков и их интенсивности, вызванных звуковым раздражителем у крыс Вистар и ГК (см. табл. 1). Длительность постиктальной каталепсии после выключения звука у крыс ГК была почти в два раза выше, чем у крыс Вистар (см. табл. 1). Каталептическое застывание проявлялось у особей ГК при отсутствии приступов. У животных популяции Вистар не наблюдалось каталептического застывания, если у них не было припадков.

Реакции в startle-боксе. По абсолютным размерам амплитуды стартл-реакции (10 звуковых сигналов) межлинейных различий по LSD-критерию не найдено. Однако по относительным значениям этого показателя у крыс ГК она была повышена в каждой точке в среднем на 32 % ($F(1, 160) = 6.6; p = 0.01$). Различия подтверждают повышенную реакцию «нервности» у крыс с наследственной кататонией.

Измерение артериального давления. Выявлена тенденция к повышенному уровню АД у крыс ГК по сравнению с Вистар под эфирным наркозом ($p = 0.08$) и через 15 мин после помещения животного в узкую трубку ($p = 0.05$). Значимый подъем уровня АД у животных линии ГК ($p < 0.05$) по сравнению с контролем был обнаружен через 30 мин после начала эксперимента (см. табл. 1).

Вес органов. В возрасте четырех месяцев масса крыс ГК была ниже на 35 % по сравнению с крысами Вистар, как и масса внутренних органов (сердца, почек и надпочечников). Значимые отличия ГК от Вистар выявлены и по относительной массе органов у крыс ГК. По сравнению с Вистар у крыс ГК было отмечено существенное увеличение массы сердца и надпочечников (см. табл. 1).

Метод главных компонент (PCA). Из 41 исследуемого признака у крыс ГК и Вистар выявлены две основные компоненты изменчивости. Они взяли на себя более половины общей дисперсии по изучаемым признакам: PC1 – 44.7 % и PC2 – 19.3 %. Большую положительную нагрузку в первую компоненту внесли вклады по реакци-

ям вздрагивания. Этот фактор был назван «амплитудой вздрагивания» (табл. 2).

Основной вклад во вторую компоненту, PC2, сформирован за счет вкладов таких показателей, как длительность

Таблица 2. Вклад фенотипических параметров в первые две компоненты

Параметр	PC1 (44.7 %)	PC2 (19.3 %)
1. Застывание	–0.22	0.58
2. Нервность	–0.10	0.93
3. Вздрагивание-1	–0.31	–0.46
4. Вздрагивание-2	–0.52	–0.06
5. Вздрагивание-3	–0.84	–0.20
6. Вздрагивание-4	–0.92	–0.20
7. Вздрагивание-5	–0.82	–0.06
8. Вздрагивание-6	–0.93	–0.14
9. Вздрагивание-7	–0.87	–0.21
10. Вздрагивание-8	–0.85	–0.32
11. Вздрагивание-9	–0.87	–0.16
12. Вздрагивание-10	–0.82	–0.27
13. Вздрагивание-1–5	–0.88	–0.28
14. Вздрагивание-6–10	–0.93	–0.24
15. Вздрагивание-1/масса тела	–0.50	–0.08
16. Вздрагивание-2/масса тела	–0.57	0.32
17. Вздрагивание-3/масса тела	–0.85	0.15
18. Вздрагивание-4/масса тела	–0.91	0.10
19. Вздрагивание-5/масса тела	–0.84	0.23
20. Вздрагивание-6/масса тела	–0.92	0.13
21. Вздрагивание-7/масса тела	–0.93	0.06
22. Вздрагивание-8/масса тела	–0.95	0.04
23. Вздрагивание-9/масса тела	–0.87	0.13
24. Вздрагивание-10/масса тела	–0.84	0.02
25. Вздрагивание-1–5/масса тела	–0.90	0.17
26. Вздрагивание-6–10/масса тела	–0.96	0.08
27. Привыкание	0.05	–0.10
28. АД под наркозом	–0.04	0.55
29. АД через 15 мин	–0.19	0.57
30. АД через 30 мин	–0.37	0.62
31. Аудиогенные припадки	0.18	–0.06
32. Каталепсия (постиктальная)	–0.40	0.45
33. Масса тела	0.06	–0.98
34. Масса сердца	0.04	–0.81
35. Масса почек	0.03	–0.95
36. Масса надпочечников	0.03	–0.59
37. Масса селезенки	–0.12	–0.85
38. Сердце/масса тела	–0.05	0.65
39. Почки/масса тела	–0.16	0.11
40. Надпочечники/масса тела	–0.02	0.73
41. Селезенка/масса тела	–0.43	0.44

Примечание. Жирным шрифтом отмечены вклады параметров ($p < 0.05$).

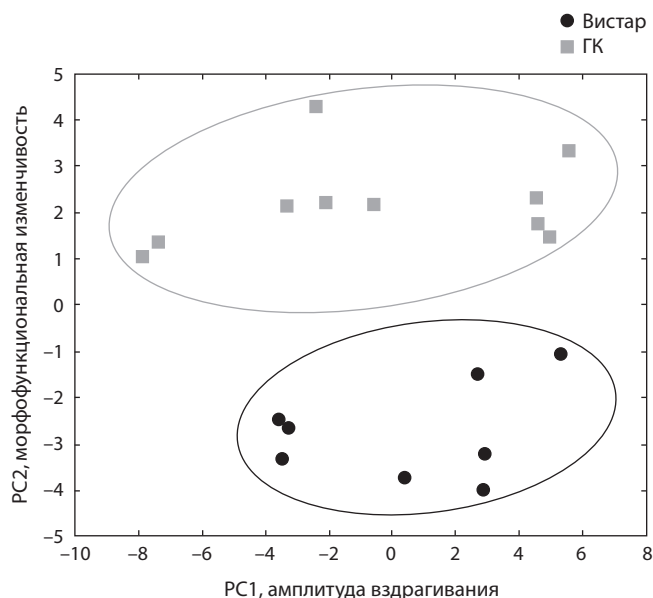


Рис. 2. Расположение особей Вистар и ГК в координатах PC1 (амплитуда вздрагивания) и PC2 (морфофункциональная изменчивость) главных компонент.

застывания, выраженность «нервности», АД под наркозом и при стрессе, масса тела, сердца, почек, надпочечников и селезенки. Вторую главную компоненту назвали «морфофункциональной изменчивостью» (см. табл. 2).

На рис. 2 показано, что пространства – «облака», сформированные из вкладов признаков в линиях ГК и Вистар, находятся в разных частях по оси морфофункциональной изменчивости. Это означает, что такие параметры, как застывание, «нервность», АД и масса исследуемых органов, взаимозависимы и различаются по расположению.

Обсуждение

Подтверждена «кататоническая» структура по ряду фенотипических признаков у крыс линии ГК в 77-м поколении селекции. Взятые в исследование параметры указывают на склонность крыс к каталептическому застыванию в домашней клетке, большую длительность постиктальной каталепсии, повышенную амплитуду реакций вздрагивания, сниженный вес тела и более высокий вес сердца и надпочечников. Значительная часть основных фактов была получена на ранних поколениях селекции (Попова и др., 1999; Алехина и др., 2016), что подтверждает наследуемость этих признаков.

У крыс линии ГК в 77-м поколении селекции еще раз было подтверждено наличие «нервных» реакций, что можно рассматривать у них как повышенный уровень тревожности. В линии НАВ (high anxiety-related behavior), селектированной по признаку проявления тревожных реакций, выявлены разнонаправленные отклонения в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и в симпатoadреналовой (САС) системах: установлены гиперреактивность в ГГНС и гипореактивность в САС. При этом был определен более высокий вес надпочечников у крыс линии НАВ по сравнению с крысами LAB (low anxiety-related behavior) (Salome et al., 2006). Такие же фенотипи-

ческие корреляты показаны и в линии ГК, селектируемой по длительности пассивно-оборонительной реакции застывания (Алехина и др., 2016). Схожесть результатов, обусловленных селекцией на тревожность и вызванные стрессом кататонические реакции, говорит об общих звеньях в физиологических механизмах, свойственных линиям ГК и НАВ, несмотря на разные критерии отбора. По-видимому, связующим звеном является повышенная общая возбудимость нервной системы, которая выражается в тревожных реакциях в линии НАВ и «нервных» реакциях в линии ГК.

Метод главных компонент позволяет объединить все исследуемые параметры, включая эмоциональные и весовые. Из суммы показателей были выделены две независимые компоненты, охватывающие более 60 % общей изменчивости. По содержанию они были обозначены нами как амплитуда вздрагивания (PC1) и морфофункциональная изменчивость (PC2). Названные компоненты являются автономными. Так, к разным компонентам относятся параметры «вздрагивания» и реакции «нервности». Этот факт объясняет снижение реакций вздрагивания и повышение уровней возбудимости на определенном этапе селекции у крыс в линии со стереотипиями (Колпаков и др., 2000). Физиологические механизмы реакций вздрагивания и стрессорных реакций также отличаются. При вздрагивании как рефлексе реагируют кохлеарные (слуховые) ядра мозга, которые находятся в его стволовой части, а при повышенной возбудимости при стрессе происходит активация верхних отделов центральной нервной системы, включая лимбические структуры и лобную кору.

Еще одно подтверждение генетического единства реакций застывания и «нервности» мы получили при помощи метода главных компонент. Оба эти параметра внесли достоверный положительный вклад в компоненту PC2. Это означает, что несмотря на их поведенческую противоположность – отсутствие двигательных реакций при застывании и повышение моторной возбудимости при проявлении «нервности», – они оказались взаимозависимы и однонаправленны. Этот факт свидетельствует о едином ядре каталептического застывания и «нервности» у крыс линии ГК (Чугуй и др., 2007). Нужно обратить внимание на то, что абсолютные и относительные весовые показатели в компоненте PC2 имеют разные знаки. Абсолютные показатели массы сердца, почек, надпочечников и селезенки вносят отрицательный вклад в PC2. Следовательно, снижение массы этих органов ассоциировано с усилением реакций застывания и «нервности». В то же время усиление этих реакций положительно коррелирует с относительной массой сердца и надпочечников (так как все эти параметры вносят в PC2 положительный вклад). В наших работах показано, что селекция на кататонию привела к снижению веса животных в линии ГК (Клочков и др., 2011; Алехина и др., 2016). Вместе с тем повышение относительного веса сердца и надпочечников представляется закономерным процессом при таких состояниях, как гипертония и «нервность». Измененная пропорция весовых показателей надпочечников стала результатом длительной селекции у крыс ГК (Алехина и др., 2016). Сходные результаты, приведшие к отклонениям в весе надпочечников, отмечены и на других селекционных мо-

делях, отбираемых по эмоциональным признакам (Plyusnina, Oskina, 1997; Redina et al., 2006; Salome et al., 2006; Solberg et al., 2006). Из анализа структуры PC2, т.е. знака и величины вкладов исследованных признаков в нее, следует, что при общем снижении веса тела и органов у крыс, селекционируемых на кататонию, уменьшение веса тела у них выражено значительно сильнее, чем снижение массы сердца и надпочечников.

Показано, что «облако» параметров, сформированное из вкладов признаков линии ГК, расположено выше «облака» Вистар по оси PC2 и не пересекается с ним (см. рис. 2). Судя по значениям параметров в PC2, эти признаки отражают уровень стрессорной реактивности и весовые показатели внутренних органов, участвующих в стрессовых реакциях. Это свидетельствует об ассоциации описанных выше признаков в организме и отличии их вкладов у крыс линий ГК и Вистар.

Таким образом, у крыс линии ГК, прошедших длительный процесс селекции, была подтверждена «кататоническая» структура поведения: показаны наследственные реакции каталепсии в покое и при стрессе и реакции «нервности». Эта структура поведения ассоциирована с умеренной гипертонией и увеличенной массой сердца и надпочечников по сравнению с крысами из исходной популяции Вистар.

Благодарности

Исследование поддержано бюджетным проектом (№ 0324-2018-0016), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 17-04-01631), выполнено с использованием оборудования ЦКП, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Авторы выражают благодарность за ценные замечания при обсуждении результатов работы сотрудникам ФИЦ ИЦиГ СО РАН д.б.н. В.М. Ефимову, к.б.н. А.В. Харламовой и к.б.н. Ю.Э. Гербеку.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алехина Т.А., Пальчикова Н.А., Кожемякина Р.В., Прокудина О.И. Признаки дестабилизации при отборе на кататонию, проявляющиеся в изменении поведенческих и соматовегетативных параметров у крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103. [Alekhina T.A., Palchikova N.A., Kozhemjakina R.V., Prokudina O.I. Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103. (in Russian)]

Амтиславский С.Я., Булыгина В., Маслова Л.Н., Алехина Т.А., Барыкина Н.Н., Чугуй В.Ф., Попова Н.К., Колпаков В.Г. Влияние перекрестного воспитания на некоторые физиологические и поведенческие признаки у крыс линии Вистар и ГК (генетическая каталепсия). Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2000; 86(12):1630-1637. [Amstislavsky S.Ya., Bulygina V., Maslova L.N., Alekhina T.A., Barykina N.N., Chuguy V.F., Popova N.K., Kolpakov V.G. Effect of cross-fostering on some physiological and behavioral features in Wistar and GC (genetically cataleptic) rat strains. Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2000;86(12):1630-1637. (in Russian)]

Беляев Д.К. О некоторых проблемах коррелятивной изменчивости и их значении для теории эволюции и селекции животных. Изв. СО АН СССР. 1962;10:111-124. [Belyaev D.K. On some problems of correlative variability and their implications for the theory of evolution and breeding animals. Izvestiya SO AN SSSR = Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. 1962;10: 111-124. (in Russian)]

Беляев Д.К., Бородин П.М. Влияние стресса на наследственную изменчивость и его роль в эволюции. Эволюционная генетика. Л.: ЛГУ, 1982;35-59. [Belyaev D.K., Borodin P.M. The impact of stress on the genetic variability and its role in evolution. In: Evolutionary genetics. Leningrad: Leningrad State University Publ., 1982; 35-59. (in Russian)]

Клочков Д.В., Алехина Т.А., Прокудина О.И. Возрастные особенности эстральной цикличности и фолликулогенеза самок крыс линии ГК, селекционированных на проявление кататонической реактивности. Бюл. эксп. биол. и мед. 2011;151(2):219-222. [Klochkov D.V., Alekhina T.A., Prokudina O.I. Age-specific features of estrous cycles and folliculogenesis in GC female rats selected by catatonic reactivity. Byulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011; 151(2):219-22. (in Russian)]

Колпаков В.Г., Алехина Т.А., Барыкина Н.Н., Чугуй В.Ф., Попова Н.К. Некоторые физиологические проявления действия гена, контролирующего предрасположенность к маятникообразным движениям у грызунов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2000;86(1):33-40. [Kolpakov V.G., Alekhina T.A., Barykina N.N., Chuguy V.F., Popova N.K. Physiological manifestations of the action of a gene regulating predisposition to a pendulum-like movements in rodents. Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2000;86(1):33-40. (in Russian)]

Оганесян Г.А., Хомутецкая О.Е., Богословский М.М., Карманова И.Г., Колпаков В.Г., Барыкина Н.Н. Цикл бодрствование-сон у крыс с генетической предрасположенностью к каталепсии. Журн. эвол. биохим. и физиол. 1990;26:376-382. [Oganesian G.A., Khomutetskaya O.E., Bogoslovskii M.M., Karmanova I.G., Kolpakov V.G., Barykina N.N. The wakefulness-sleep cycle in rats with a genetic predisposition to catalepsy. Zhurnal Evolyutsionnoy Biokhimii i Fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 1990;26(3):376-82. (in Russian)]

Попова Н.К., Барыкина Н.Н., Плюснина И.З., Алехина Т.А., Колпаков В.Г. Экспрессия реакции испуга у крыс, генетически предрасположенных к разным типам защитного поведения. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1999;85(1):99-104. [Popova N.K., Barykina N.N., Plyusnina I.Z., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Manifestation of fear response in rats genetically predisposed to various kinds of defense behavior. Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal. 1999; 85(1):99-104. (in Russian)]

Редина О.Е., Смоленская С.Э., Абрамова Т.О., Маркель А.Л. Генетические локусы, контролирующие вес селезенки и уровень артериального давления, у крыс линии НИСАГ со стресс-зависимой артериальной гипертензией. Молекуляр. биология. 2014; 48(3):407-415. [Redina O.E., Smolenskaya S.E., Abramova T.O., Markel A.L. Genetic loci for spleen weight and blood pressure in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension. Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology (Moscow). 2014; 48(3):407-415. (in Russian)]

Чугуй В.Ф., Колпаков В.Г., Барыкина Н.Н. Каталепсия и «нервность» у крыс. Результаты повторной селекции. Генетика. 2007; 43(2):276-279. [Chuguy V.F., Kolpakov V.G., Barykina N.N. Catalepsy and "nervousness" in rats: results of replicated selection. Genetika = Genetics (Moscow). 2007;43(2):276-279. (in Russian)]

Шульга В.А., Барыкина Н.Н., Алехина Т.А., Колпаков В.Г. Некоторые физиологические характеристики генетической предрасположенности к каталепсии у крыс в зависимости от стадии селекции. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1996; 82(10-11):77-83. [Shulga V.A., Barykina N.N., Alekhina T.A., Kol-

- pakov V.G. Some physiological characteristics of genetic predisposition of rats to catalepsy. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 1996; 82(10-11):77-83. (in Russian)]
- Ferré P., Fernández-Teruel A., Escorihuela R.M., Driscoll P., Corda M.G., Giorgi O., Tobefia A. Behavior of the Romans/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests, relationship with defecation and self-grooming. *Physiol. Behav.* 1995;58:1209-1213.
- Himmler B.T., Stryjek R.S., Modlinska K., Derksen S.M., Pisula W., Pellis S.M. How domestication modulates play behavior: a comparative analysis between wild rats and a laboratory strain of *Rattus norvegicus*. *J. Comp. Psychol.* 2013;127(4):453-464. DOI 10.1037/a0032187.
- Hlavacova N., Bakos J., Jezova D. Differences in home cage behavior and endocrine parameters in rats of four strains. *Endocr. Regul.* 2006;40(4):113-118.
- Javelot H., Weiner L., Terramorsi R., Rougeot C., Lalonde R., Mes-saoudi M. Efficacy of chronic antidepressant treatments in a new model of extreme anxiety in rats. *Depress. Res. Treat.* 2011;1-10. DOI 10.1155/2011/531435.
- Kosti O., Raven P.W., Renshaw D., Hinson J.P. Intra-adrenal mechanisms in the response to chronic stress: investigation in rat model of emotionality. *J. Endocrinol.* 2006;189:211-218. DOI 10.1677/joe.1.06638.
- Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Markel A.L., Naumenko E.V. Brain catecholamines and the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system in inherited arterial hypertension. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1998;28(1):38-44.
- Nikulina E.M., Popova N.K., Kolpakov V.G., Alekhina T.A. Brain dopaminergic system in rats with a genetic predisposition to catalepsy. *Biogenic Amines*. 1987;4(4-6):399-406.
- Pfeffer J.M., Pfeffer M.A., Flochlich E.D. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in un-anesthetized normotensive rats. *J. Lab. Clin. Med.* 1971;78:962-975.
- Plusnina I.Z., Oskina I.N. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness towards humans. *Physiol. Behav.* 1997;61(3):381-385.
- Ramos A., Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Behav. Rev.* 1998;22(1):33-57.
- Redina O.E., Mashanova N.A., Efimov V.M., Markel A.L. Rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH strain) display specific QTL for blood pressure and for body and kidney weight on chromosome 1. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006;33:456-464.
- Roman O., Seres J., Pometlova M., Jurcovicova J. Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Endocr. Regul.* 2004;38(4):151-155.
- Salome N., Vitart O., Lesage J., Landgraf R., Vieau D., Laborie C. Altered hypothalamo-pituitary-adrenal and sympatho-adrenomedullary activities in rats bred for anxiety: central and peripheral correlates. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31:724-735. DOI 10.1016/j.psyneuen.2006.02.002.
- Solberg L.C., Baum A.E., Ahmadiyeh N., Shimomura K., Li R., Turek F.W., Takahashi J.S., Churchill G.A., Redei E.E. Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol. Genomics*. 2006;27:362-369. DOI 10.1152/physiolgenomics.00052.2006.



Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита

И.К. Байков¹✉, Л.А. Емельянова^{1,2}, Л.М. Соколова¹, Е.М. Карелина^{1,2}, А.А. Матвеев^{1,2}, И.В. Бабкин^{1,2}, Я.А. Хлусевич^{1,2}, В.Ф. Подгорный¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время на основе протективного химерного антитела ch14D5a разрабатывается препарат для профилактики и терапии вируса клещевого энцефалита. Вместе с тем эпитоп, узнаваемый этим антителом на поверхности гликопротеина E, не локализован. Для терапевтического использования антитела ch14D5a крайне желательно знать механизм действия этого антитела, в том числе узнаваемый им эпитоп. Целью данной работы было выявить домен гликопротеина E, с которым связывается протективное антитело ch14D5a. Для этого с использованием бактериальной системы экспрессии было получено четыре рекомбинантных варианта гликопротеина E: 1) белок rE, содержащий домены D1, D2 и D3 гликопротеина E; 2) белок rED1+2, содержащий домены D1 и D2; 3) белок rED3_301, представляющий собой домен D3; 4) белок rED3_294, включающий домен D3 и шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3. Белки rED3_294 и rED3_301 были получены в растворимой мономерной форме, что подтверждено гель-фильтрационной хроматографией. Белки rE и rED1+2 экстрагированы из телец включения. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса установлено, что протективное химерное антитело ch14D5a и его Fab-фрагмент связываются с доменом D3 и не связываются с доменами D1 и D2 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Поскольку антитела, узнающие эпитопы на поверхности домена D3, не склонны вызывать антителозависимое усиление инфекции по сравнению с антителами, направленными на домены D1 и D2, полученные данные подтверждают перспективность использования антитела ch14D5a при создании терапевтического препарата против вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; гликопротеин E; домен D3; антитело; рекомбинантный белок; поверхностный плазмонный резонанс; картирование эпитопа.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М., Матвеев А.Л., Бабкин И.В., Хлусевич Я.А., Подгорный В.Ф., Тикунова Н.В. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Baykov I.K., Emelyanova L.A., Sokolova L.M., Karelina E.M., Matveev A.L., Babkin I.V., Khlusevich Ya.A., Podgornyy V.F., Tikunova N.V. Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383 (in Russian)

Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus

I.K. Baykov¹✉, L.A. Emelyanova^{1,2}, L.M. Sokolova¹, E.M. Karelina^{1,2}, A.L. Matveev^{1,2}, I.V. Babkin^{1,2}, Ya.A. Khlusevich^{1,2}, V.F. Podgornyy¹, N.V. Tikunova^{1,2}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

A drug for the prevention and therapy of tick-borne encephalitis virus is being developed on the basis of the protective chimeric antibody ch14D5a. At the same time, the epitope recognized by this antibody on the surface of glycoprotein E has not been localized yet. The aim of this work was to identify the domain of glycoprotein E, to which the protective antibody ch14D5a binds. As a result, four recombinant variants of glycoprotein E were generated using the bacterial expression system: (1) the rE protein containing the domains D1, D2, and D3 of glycoprotein E; (2) the rED1+2 protein containing domains D1 and D2; (3) the rED3_301 protein, which is domain D3 of glycoprotein E, and (4) the rED3_294 protein comprising domain D3 and a hinge region connecting domains D1 and D3. The rED3_294 and rED3_301 proteins were obtained in soluble monomeric form. The rE and rED1+2 proteins were extracted from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. Using Western blot analysis and surface plasmon resonance analysis, it was demonstrated that the protective chimeric antibody ch14D5a and its Fab fragment bound specifically to domain D3 of glycoprotein E. Since the antibodies recognizing epitopes on the surface of domain D3 do not tend to cause antibody-dependent enhancement of the infection as compared to antibodies directed to domains D1 and D2, the data obtained confirm the promise of using the antibody ch14D5a in the development of a therapeutic preparation against the tick-borne encephalitis virus.

Key words: tick-borne encephalitis virus; glycoprotein E; domain D3; antibody; recombinant protein; surface plasmon resonance; epitope mapping.

Флавивirusы – семейство РНК-содержащих virusов, включающих множество возбудителей опасных заболеваний человека. Актуальность получения рекомбинантных аналогов поверхностных белков различных флавивirusов определяется необходимостью разработки вакцин нового поколения (Chen, 2015; Rey et al., 2018), создания высокочувствительных тест-систем (Holbrook et al., 2004; Zidane et al., 2013), а также проведения структурных исследований (Rey et al., 1995; Wu et al., 2003; Volk et al., 2009). Рекомбинантные флавивиральные белки используются при изучении эпитопов, узнаваемых потенциально терапевтическими высоконейтрализующими и протективными антителами (Nybakken et al., 2005; Robinson et al., 2015; Barba-Spaeth et al., 2016; Zhao et al., 2016; Wang et al., 2017).

Антигенная структура флавивирального гликопротеина Е непосредственным образом связана с пространственной структурой этого белка и его ориентацией на поверхности вириона. Гликопротеин Е расположен на поверхности зрелого вириона флавивirusов в количестве 180 молекул, организованных в виде 90 гомодимеров. Он состоит из доменов D1, D2 и D3 (рис. 1, а), а также двух трансмембранных доменов. D1 – центральный домен, объединяющий домены D2 и D3. Домен D2 отвечает за димеризацию гликопротеина Е, а также содержит гидрофобную петлю слияния, которая участвует в выходе вирусного капсида из эндосомы в цитоплазму клетки. Домен D3 взаимодействует с различными клеточными рецепторами и участвует в проникновении virusа в заражаемую клетку (Pierson, Kielian, 2013).

Доменная структура гликопротеина Е стабилизирована шестью дисульфидными связями, консервативными для всех флавивirusов. Известно, что эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими и протективными антителами, расположены во всех трех доменах гликопротеина (Dowd, Pierson, 2011). Эпитопы мышиных моноклональных антител, обладающих наиболее выраженными вируснейтрализующими и протективными свойствами, находятся преимущественно в области домена D3 (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016), поэтому антитела, направленные к этому домену, представляют наибольший интерес с точки зрения профилактики и терапии флавивиральных инфекций. Известно также, что высоконейтрализующие и протективные антитела, направленные к петле слияния, вызывают антителозависимое усиление инфекции (Haslwanter et al., 2017). В связи с этим при разработке терапевтических препаратов против флавивirusов для потенциально терапевтического антитела должно быть подтверждено отсутствие связывания с петлей слияния гликопротеина Е.

Ранее на основе вируснейтрализующих моноклональных мышиных антител (Tsekhanovskaya et al., 1993) нами было сконструировано высокоаффинное химерное антитело ch14D5a, обладавшее способностью эффективно защищать модельных животных от сотен летальных доз virusа клещевого энцефалита (ВКЭ) (Baykov et al., 2014; Тикунова и др., 2015). Доклинические испытания этого антитела показали его высокую эффективность, а также отсутствие токсических свойств (Тикунова и др., 2015). Однако для терапевтического использования препарата на

основе антитела ch14D5a необходимо детальное исследование механизма действия этого антитела, в том числе локализация эпитопа, с которым связывается антитело на поверхности гликопротеина Е.

Цель данной работы – выявить домен гликопротеина Е virusа клещевого энцефалита, с которым связывается протективное химерное антитело ch14D5a. Для этого были получены рекомбинантные белки, представляющие собой фрагменты гликопротеина Е, и исследовано взаимодействие антитела ch14D5a с этими белками методами поверхностного плазмонного резонанса и вестерн-блот анализа.

Материалы и методы

Материалы. Химерное антитело ch14D5a было наработано и очищено согласно методике, опубликованной ранее (Baykov et al., 2014). Fab-фрагмент антитела получен с использованием набора Pierce™ Fab Micro Preparation Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Комплементарная ДНК гена *E* virusа клещевого энцефалита, штамм Софийн, была предоставлена С.Е. Ткачёвым, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

Создание генетических конструкций для получения фрагментов гликопротеина Е. Фрагменты ДНК, кодирующие рекомбинантные белки rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE, были получены методом ПЦР по матрице кДНК гена *E* virusа клещевого энцефалита, штамм Sofjin-Ru (GenBank: AEP20480.1), с использованием праймеров: rED3_301_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCG GCGGTGGCTCGGGTCTTACATACACAATGTGCG-3'; rED3_294_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCGCGGGTG GCTCGCTAGAAAACTTAAGATGAAAGGTC-3'; rED3_his_NotI_rev: 5'-TTAGCGGCCGCTTAGTGATG GTGATGATGATGACTCCCTTTTGGAAACCATTTG-3'; rED1_SfiI_dir: 5'-ATAGGCCAGCCGCCATGGCCTC ACGGTGCACACATCTGG-3'; rED2_his_NotI_rev: 5'-TTA GCGGCCGCTTAGTGATGGTGATGATGATGTTTCAT CTTAAGTTTTCTAGCCC-3'. Фрагмент, кодирующий белок rED3_294, получен с использованием праймеров rED3_294_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev. Фрагмент, кодирующий белок rED3_301, – с использованием праймеров rED3_301_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev. С помощью праймеров rED1_SfiI_dir и rED2_his_NotI_rev получали фрагмент, кодирующий белок rED1+2, а с помощью праймеров rED1_SfiI_dir и rED3_his_NotI_rev – фрагмент, кодирующий белок rE.

Гены рекомбинантных белков кодировали глицин-сериновую последовательность на N-конце для повышения растворимости, а также C-концевую гексагистидиновую последовательность для очистки белков на Ni-NTA сорбенте. ДНК-фрагменты, кодирующие белки rED3_294 и rED3_301, были встроены в плазмидную ДНК рHEN2 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *NotI*. Фрагменты, кодирующие белки rED1+2 и rE, были встроены в ту же плазмиду по сайтам *SfiI* и *NotI*. Правильность конструкций рHEN2-rED3_294, рHEN2-rED3_301, рHEN2-rED1+2 и рHEN2-rE подтверждали секвенированием. Описанные конструкции депонированы в базу GenBank и имеют следующие номера: MH319019, MH383220, MH383221 и MH383222.

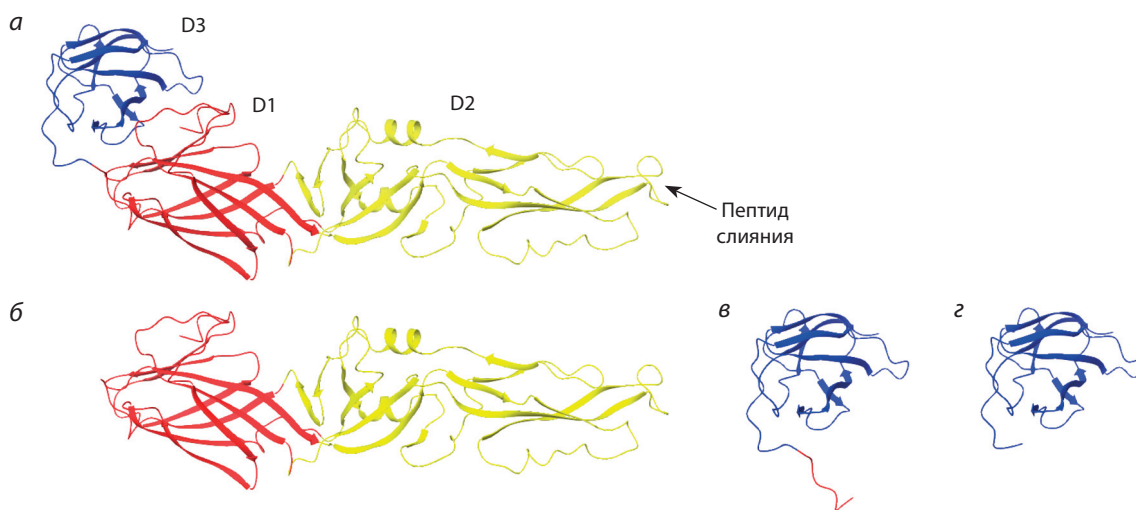


Рис. 1. Фрагменты пространственной структуры эктодомена гликопротеина Е, соответствующие белку гЕ (а), содержащему домены D1, D2 и D3; белку гЕD1+2 (б), содержащему домены D1 и D2; белкам гЕD3_294 (в) и гЕD3_301 (г). Изображения подготовлены в программе Rymol на основе структуры 1SVB, представленной в Protein Data Bank.

Получение рекомбинантных белков. Бактерии *Escherichia coli* HB2151, трансформированные соответствующей плазмидной ДНК, растили в среде LB с добавлением ампициллина и 0.1 % глюкозы при скорости перемешивания 180 об./мин и температуре 37 °С. При достижении оптической плотности OD600 = 0.7–0.9 синтез белка индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0.5 mM, а рост культуры продолжали при скорости перемешивания 180 об./мин и 30 °С. Через 4 ч биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием 10 мин при 6000 g, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 % сахарозы, 1 mM ЭДТА и 10 mM трис-HCl, pH 7.5, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры. После инкубации 5 мин при комнатной температуре и 5 мин при 0 °С клетки осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С. После удаления супернатанта клеточный осадок ресуспендировали в 5 mM растворе MgSO₄, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры, и инкубировали 5 мин при 0 °С. Образовавшиеся сферопласты осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С, а супернатант, содержащий периплазматические белки, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0.22 мкм и замораживали. Осадок сферопластов также замораживали.

При получении гЕD3_294 либо гЕD3_301 фракцию периплазматических белков наносили на хроматографическую колонку, упакованную 4 мл Ni-NTA агарозы (Novagen) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для промывки колонки и элюции использовали фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР) с добавлением NaCl до 300 mM, содержащий различные концентрации имидазола. После нанесения периплазматической фракции хроматографическую колонку промывали 5 объемами буфера, не содержащего имидазола. Неспецифически связавшиеся белки элюировали буфером с 25 mM имидазола, после чего целевой белок элюировали буфером с 300 mM имидазола. С помощью фильтров Amicon ultra-4 с порогом отсека 3 кДа осуществляли диафильтрацию буфера и

концентрирование белка до 2–4 мг/мл. Белок фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм и хранили при 4 °С в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7.4, с добавлением 0.02 % азида натрия.

При получении белков гЕ и гЕD1+2 использовали осадок сферопластов, оставшийся после выделения периплазматических белков. Осадок подвергали обработке ультразвуком в течение 3 мин, после чего суспензию центрифугировали 15 мин при 12000 g. Супернатант, содержащий цитоплазматические белки, замораживали. Осадок, представляющий собой клеточный дебрис, растворяли в ФСБР, содержащем 8 M мочевины, при комнатной температуре в течение 30 мин, затем центрифугировали 15 мин при 12000 g. Целевой белок выделяли из супернатанта аффинной хроматографией аналогично тому, как это делали для белков гЕD3_294 и гЕD3_301, с тем лишь исключением, что все растворы содержали 8 M мочевины. Белки хранили в ФСБР, содержащем 8 M мочевины, при –20 °С.

Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков. Клеточные лизаты и фракции периплазматических белков фракционировали электрофорезом в 15 % денатурирующем полиакриламидном геле, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) электропереносом в буфере, содержащем 25 mM трис, 192 mM глицина, 0.1 % додецилсульфат натрия и 20 % этанол, и окрашивали красителем «пунцовый S». Последующие стадии осуществляли в термостатируемом шейкере при 37 °С. Мембрану блокировали 5 % суспензией обезжиренного сухого молока в течение 45 мин. После трехкратного промывания мембраны ФСБР, содержащим 0.05 % твин-20 (ФСБР-твин), к мембране добавляли раствор антитела 6x-His Tag Monoclonal Antibody (4A12E4) (Invitrogen), разведенного в том же буфере в соотношении 1:10000. После 45-минутной инкубации и трехкратного промывания мембраны ФСБР-твин к мембране добавляли раствор вторичного антитела, конъюгированного с щелочной фосфатазой, Anti-Mouse IgG (Fc specific)–Alkaline

Phosphatase antibody produced in goat, A1418 (Sigma). После 45-минутной инкубации и трехкратного промывания мембраны ФСБР-твин мембрану промывали AP-буфером (100 мМ трис-HCl, pH 9.5, 100 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂) и производили окрашивание мембраны раствором хромогенов BCIP-T (пара-толуидиновая соль 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата) (Fermentas) и NBT (nitro blue tetrazolium chloride) (Fermentas) в том же буфере до появления окраски. Окрашенную мембрану промывали дистиллятом и сканировали.

В случае вестерн-блот анализа с использованием антитела ch14D5a процедуру осуществляли аналогично, при этом антитело ch14D5a применяли в конечной концентрации 1 мкг/мл, а в качестве вторичного антитела использовали Anti-Human IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, A1543 (Sigma).

Исследование взаимодействия антитела ch14D5a и его Fab-фрагмента с рекомбинантными фрагментами гликопротеина E на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36. Эксперименты проводили в ФРСБ с добавлением 0.005 % твин-20 и 0.1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА). Поверхность HTG-чипа активировали пропусканием 1 мМ водного раствора Ni(NO₃)₂ в течение 120 с. Рекомбинантные белки нековалентно иммобилизовали на поверхности HTG-чипа в концентрации 3 мкг/мл до достижения уровня сигнала 50–70 ед. отклика. Последовательные трехкратные разведения Fab-фрагмента антитела ch14D5a в концентрации 260, 87, 29, 9.6 и 3.2 нМ анализировали на связывание с рекомбинантными белками. В качестве референсного был взят сигнал, зарегистрированный для буфера, не содержащего Fab-фрагмента, а также сигнал, полученный при пропускании разведений Fab-фрагмента в той части чипа, где не было иммобилизовано белков. Скорректированный таким образом сигнал использовали для вычисления кинетических и равновесных констант методом глобального выравнивания на основе простой модели односайтового связывания с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.1.0. В случае антитела ch14D5a анализировали трехкратные разведения антитела в концентрации 81, 27, 9, 3 и 1 нМ.

Гель-фильтрационная хроматография. Хроматографический профиль образцов белков gED3_294 и gED3_301 был проанализирован на колонке Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) с помощью хроматографа AKTA pure (GE Healthcare). Профильтрованный образец белка вносили в количестве 100 мкл и фракционировали со скоростью потока 0.5 мл/мин. Оптическую плотность на выходе из колонки анализировали на длинах волн 214 и 280 нм. В качестве референсных белков были использованы РНКаза А (13.7 кДа), лизоцим куриных яиц (14.3 кДа) и одноцепочечное антитело 14D5 (27 кДа). Эксперименты проводили в буфере ФСБР.

Обработка дебриса детергентом. Клеточный дебрис, оставшийся в результате центрифугирования бактерий, предварительно обработанных ультразвуком, ресуспендировали в буфере (50 мМ трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl), содержащем 0.5 %, 1 % или 1.5 % детергента тритон ×100. Образцы инкубировали в течение ночи при 4 °C. Центрифугировали 10 мин при 12000 g,

анализировали осадок и супернатант денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле.

Результаты

Получение рекомбинантных фрагментов гликопротеина E ВКЭ

Рекомбинантные фрагменты гликопротеина E были разработаны в результате экспрессии в бактериях *E. coli* HB2151. Для этого были сконструированы плазмидные ДНК на основе ДНК pHEN2, содержащей сигнальную последовательность гена пектат-лиазы В (pelB). Эта последовательность направляет синтез белка в периплазматическое пространство *E. coli*, которое обладает более высоким окислительным потенциалом, а также содержит белки клеточной системы Dsb, способствующие образованию дисульфидных связей, необходимых для стабилизации пространственной структуры белка (Berkmen, 2012), что способствует образованию правильной конформации белковой молекулы и накоплению белка в растворимой форме. Всего было сконструировано четыре рекомбинантных фрагмента гликопротеина E: 1) белок gE, содержащий домены D1, D2 и D3, аминокислотные остатки (а.к.о.) 1–397 гликопротеина E ВКЭ; 2) белок gED1+2, содержащий домены D1 и D2 (а.к.о. 1–302 гликопротеина E); 3) белок gED3_301, представляющий собой домен D3 (а.к.о. 301–397 гликопротеина E); 4) белок gED3_294 (а.к.о. 294–397 гликопротеина E), включающий домен D3 и шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3. Все рекомбинантные белки содержали гексагистидиновую последовательность на С-конце и не содержали С-концевой трансмембранный участок (а.к.о. 398–496). На рис. 1 представлены соответствующие фрагменты пространственной структуры эктодомена гликопротеина E (Rey et al., 1995, PDB_id: 1SVB).

В результате индукции бактерий, трансформированных соответствующими плазмидными ДНК, были получены клеточные лизаты, содержащие необходимые белки. Белки фракционировали гель-электрофорезом в восстановительных условиях (рис. 2, а) и выявляли антителом против гексагистидиновой последовательности в вестерн-блот анализе для соотнесения полос на геле целевым белкам (см. рис. 2, б). Белки gED3_294 и gED3_301 находились в растворимом виде в периплазматическом пространстве клеток (см. рис. 2, а, дорожки 1 и 2). Белок gE присутствовал в небольшом количестве в цитоплазме клеток в растворимом виде и выявлялся вестерн-блот анализом антителом против гексагистидиновой последовательности (см. рис. 2, б, дорожка б). Вместе с тем большая часть белков gE и gED1+2 была расположена в клеточном дебрисе, оставшемся после выделения периплазмы и цитоплазмы (см. рис. 2, а, дорожки 3 и 4). Кроме того, зарегистрированы в небольшом количестве дополнительные формы белков gED3_294 и gE, незначительно отличающиеся по электрофоретической подвижности. Присутствие этих форм может быть вызвано неполным отщеплением лидерного пептида от целевого белка.

Была проверена гипотеза о том, что белки gED1+2 и gE находятся преимущественно в нерастворимом виде из-за того, что они связаны с фрагментами бактериаль-

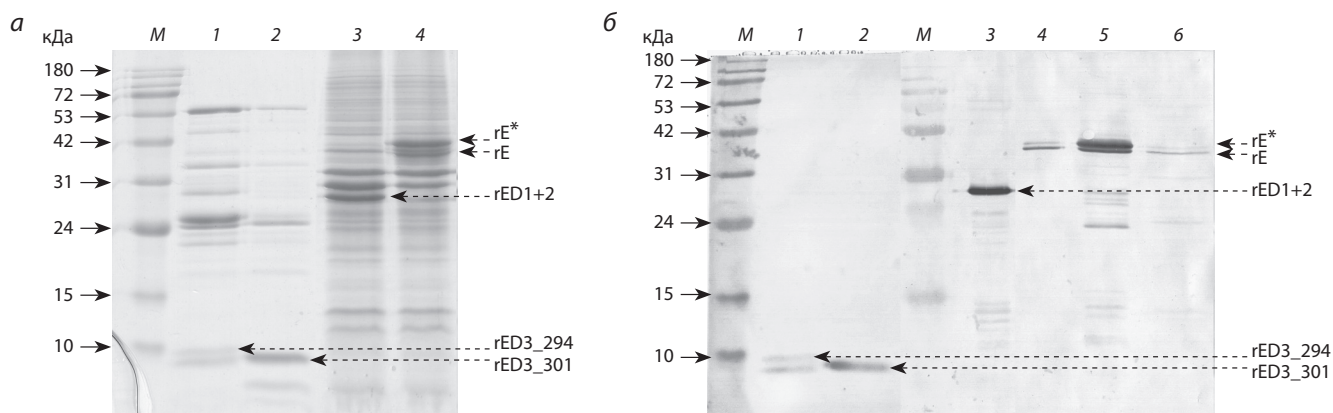


Рис. 2. Анализ клеточных фракций, содержащих рекомбинантные белки rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE: а – электрофоретический в 15 % денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ); б – вестерн-блот анализ антителом против гексагистидиновой последовательности.

1, 2 – периплазматические фракции бактерий, трансформированных плазмидами pHEN2-rED3_294 и pHEN2-rED3_301 соответственно; 3 – клеточный дебрис бактерий, трансформированных плазмидой pHEN2-rED1+2; 4, 5 – клеточный дебрис бактерий, трансформированных плазмидой pHEN2-rE; 6 – цитоплазматическая фракция бактерий, трансформированных плазмидой pHEN2-rE; М – белковый маркер молекулярных масс. Образцы подготовлены в присутствии дитиотреитола.

ной мембраны при помощи гидрофобной петли слияния (а.к.о. 98–111 гликопротеина Е), расположенной в домене D2. Однако после обработки клеточного дебриса буфером, содержащим 0.5 %, 1 % или 1.5 % тритона $\times 100$, белки rED1+2 и rE по-прежнему находились в осадке и не переходили в супернатант.

Белки rED3_294 и rED3_301 были выделены из периплазматической фракции Ni-NTA хроматографией. Методом гель-фильтрационной хроматографии в отсутствие детергентов было показано, что белки rED3_294 и rED3_301 соответствовали по времени удержания на колонке белкам с молекулярной массой около 12 кДа, следовательно, эти белки находились в растворе в виде мономеров и не образовывали агрегатов.

Анализ связывания рекомбинантных белков rED3_294, rED3_301, rED1+2 и rE с антителом ch14D5a

Полученные белки в виде клеточных лизатов и периплазматических фракций были исследованы вестерн-блот анализом на специфическое связывание с антителом ch14D5a. В результате обнаружено, что антитело связывается с белками rED3_294, rED3_301 и rE, но не связывается с белком rED1+2 (рис. 3). Это свидетельствует о том, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5a, расположен на домене D3 гликопротеина Е ВКЭ, причем шарнирный участок, соединяющий домены D1 и D3, не принимает участия во взаимодействии с антителом ch14D5a.

Сродство антитела ch14D5a и Fab-фрагмента этого антитела к белкам rED3_294 и rED3_301 было измерено с помощью оптического биосенсора ProteOn XPR 36 (Bio-Rad), использующего явление поверхностного плазмонного резонанса (рис. 4). Белки rED3_294 и rED3_301 иммобилизовали на поверхность чипа и анализировали их связывание с антителом ch14D5a и его Fab-фрагментом. В случае взаимодействия с Fab-фрагментом измеряли аффинность, которая для белков rED3_294 и rED3_301 составила 53 ± 3 и 48 ± 3 нМ соответственно (см. рис. 4, а, б). В случае антитела ch14D5a измеряли значение кажущейся (эффективной) константы диссоциации, называемой так-

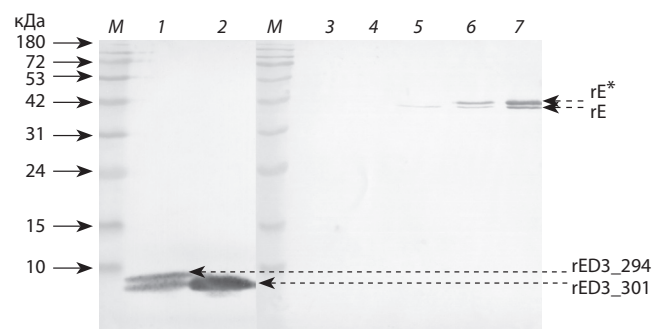


Рис. 3. Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков антителом ch14D5a.

1 – rED3_294; 2 – rED3_301; 3, 4 – rED1+2; 5–7 – rE; М – белковый маркер молекулярных масс. Белки предварительно разделены в 15 % ПААГ в денатурирующих условиях и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану.

же avidностью, которая характеризует взаимодействие полноразмерного антитела, имеющего два антигенсвязывающих домена, с поверхностью, покрытой множеством молекул антигена. Полученное значение кажущейся (эффективной) константы диссоциации составило для обоих вариантов домена D3 около 1.5 ± 0.2 нМ (см. рис. 4, в).

Чтобы оценить вклад доменов D1 и D2 в связывание антитела ch14D5a с гликопротеином Е, мы исследовали взаимодействие Fab-фрагмента этого антитела с белком rE, содержащим все три домена. Полученное значение константы диссоциации находилось на уровне сродства Fab-фрагмента к белкам rED3_294 и rED3_301 и составило 45 ± 3 нМ (см. рис. 4, з), что свидетельствует об отсутствии значимого вклада доменов D1 и D2 в связывание антитела с гликопротеином Е.

Стабильность белка

Хранение белков rED3_294 и rED3_301 в течение года при 4 °С в концентрации 2–4 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с добавлением азиды натрия не приводило ни к выпадению осадка, ни к изменению активности белка.

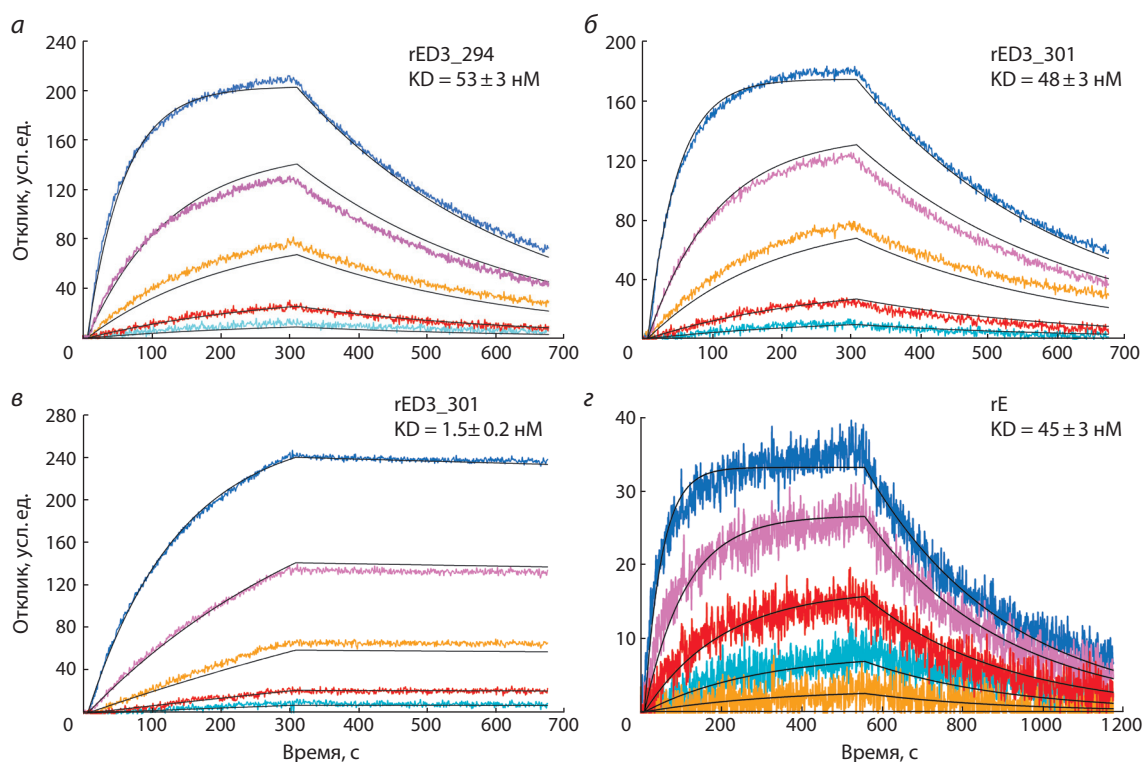


Рис. 4. Анализ связывания Fab-фрагмента антитела ch14D5a с белками rED3_294 (а), rED3_301 (б) и rE (з), а также связывания антитела ch14D5a с белком rED3_301 (г).

KD – константа диссоциации.

Обсуждение

Домен D3 гликопротеина Е флавивирусов по пространственной структуре относится к семейству иммуноглобулиновых доменов. Это достаточно стабильный домен, дополнительно стабилизированный одной консервативной дисульфидной связью. Рекombинантные белки, представляющие собой домены D3 некоторых флавивирусов, таких как вирус желтой лихорадки, вирус Денге, вирус западного Нила и вирус Лангат, были получены в бактериальных системах экспрессии как в виде телец включения с последующим рефолдингом белка (Volk et al., 2009; Elahi et al., 2014; Kulkarni et al., 2016), так и в растворимом виде в формате белков слияния (White et al., 2003; Volk et al., 2006; Maillard et al., 2008). В случае периплазматической экспрессии домены D3 вируса японского энцефалита и вируса лихорадки Денге были получены в нативной конформации без рефолдинга и отщепления белка-носителя (Wu et al., 2003; Lisova et al., 2007; Yang et al., 2012).

Для вируса клещевого энцефалита известны всего две работы по конструированию рекомбинантного домена D3. В одной из них белок D3 образовывался в растворимом виде, однако аминокислотная последовательность этого белка соответствовала штамму Найдорф европейского подтипа ВКЭ (Jarmer et al., 2014) и отличалась от последовательности штамма Софьин дальневосточного подтипа, использованной в нашем исследовании. В другой работе рекомбинантные домены D3 были получены для штаммов европейского, сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ, однако белки образовывали тельца включения (Ershova et al., 2016), что, как правило, вызвано нарушенным фолдингом белка (Fink, 1998; Carrió, Villaverde, 2005).

В нашем случае требовалось получить растворимый мономерный белок, пространственная структура которого была бы максимально приближена к структуре домена D3 природного гликопротеина Е ВКЭ, поэтому была выбрана система бактериальной экспрессии с транслокацией белка в периплазматическое пространство клеток за счет лидерного пептида пектат-лиазы В (pelB). В результате оба варианта домена D3, rED3_294 и rED3_301, были получены без применения хаотропных агентов и рефолдинга, а растворимость и мономерность сконструированных белков были подтверждены гель-фильтрацией.

Для получения белка гЕ, представляющего собой эктодомен гликопротеина Е ВКЭ, мы также использовали лидерный сигнал pelB, направляющий синтез в периплазму, и относительно слабый lac промотор. Это делалось с целью снижения эффективности транскрипции и уменьшения вероятности образования телец включения. Тем не менее белок гЕ присутствовал в растворимой форме лишь в небольшом количестве, в то время как основная часть белка присутствовала в клеточном дебрисе предположительно в виде телец включения. Вместе с тем полученный белок однозначно выявлялся исследуемым антителом ch14D5a в вестерн-блот анализе, что совместно с другими наблюдениями позволило нам локализовать эпитоп этого антитела с точностью до домена.

Созданные нами белки были использованы для выявления домена гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, узнаваемого антителом ch14D5a, на основе которого разрабатывается терапевтический препарат. Оба варианта rED3_294 и rED3_301, отличающиеся N-концевой частью, показали сходное сродство к антителу ch14D5a и

Fab-фрагменту этого антитела, из чего мы заключили, что область с 294 по 300 а.к.о. гликопротеина Е, которая отсутствует в белке gED3_301, не вносит существенного вклада в связывание антитела ch14D5a с гликопротеином Е ВКЭ и не входит в состав эпитопа, узнаваемого этим антителом.

Поскольку известны вируснейтрализующие антитела к гликопротеину Е флавивирусов, эпитоп которых расположен на нескольких доменах одновременно (de Alwis et al., 2012; Sun et al., 2017), было необходимо проверить, связывается ли антитело ch14D5a с доменами D1 или D2. Вестерн-блот анализ с использованием белка gED1+2 не выявил связывания антитела с этим белком. Белок gE, отличающийся от белка gED1+2 только наличием домена D3, однозначно выявлялся антителом ch14D5a. Кроме того, сродство Fab-фрагмента антитела ch14D5a к домену D3, измеренное с помощью биосенсора ProteOn, оказалось очень близко по величине к сродству этого же Fab-фрагмента к белку gE, содержащему все три домена (D1, D2 и D3) гликопротеина Е ВКЭ. То есть присутствие доменов D1/D2 не усиливало взаимодействия антитела с антигеном. На основании этих данных можно заключить, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5a, полностью находится в составе домена D3 и не перекрывается с доменами D1 и D2.

Ранее при исследовании мышиных и человеческих антител, образующихся в результате иммунного ответа на флавивирусные инфекции, было установлено, что антитела, направленные на домен D3, обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами, направленными на другие участки гликопротеина Е (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016). С одной стороны, эти антитела, как правило, обладают высокой вируснейтрализующей и протективной активностью, что может быть вызвано их способностью блокировать взаимодействие домена D3 с клеточными рецепторами. С другой стороны, антитела против домена D3 не склонны вызывать антителозависимое усиление инфекции, тогда как антитела к доменам D1 и D2, в частности антитела к петле слияния, могут усиливать инфекционность флавивирусов *in vivo* и приводить к усилению инфекции у людей (Dowd, Pierson, 2011; Halstead, 2014; Haslwanter et al., 2017; Katzelnick et al., 2017). Вместе с тем при иммунизации людей большинство образующихся антител направлено на домены D1 и D2 (Oliphant et al., 2007; Crill et al., 2009; Wahala et al., 2009; Vratskikh et al., 2013; Jarmer et al., 2014). С этой точки зрения, расположение эпитопа, узнаваемого антителом ch14D5a, в области домена D3 гликопротеина Е подчеркивает потенциальные преимущества подхода/препарата, который может быть создан на основе этого антитела, по сравнению с препаратами сывороточных антител человека против вируса клещевого энцефалита, которые преимущественно содержат антитела к доменам D1 и D2.

На основе количественных данных, полученных в экспериментах с использованием биосенсора ProteOn, взаимодействие между антителом ch14D5a и доменом D3 можно охарактеризовать как высокоаффинное. В случае антител принято разделять истинное сродство, проявляемое одним антигенсвязывающим центром, и эффективное сродство, определяемое совокупностью всех контактов антитела с антигеном. При взаимодействии противови-

русных антител с вирионом, покрытым множеством копий поверхностного белка, значение эффективной аффинности гораздо точнее характеризует прочность взаимодействия по сравнению с константой аффинности одновалентного взаимодействия (Wang, Yang, 2010). В случае антитела ch14D5a, несмотря на умеренную аффинность Fab-фрагмента этого антитела по отношению к домену D3, эффективная аффинность полноразмерного антитела находится на уровне 1.5 нМ, что в совокупности с благоприятным расположением эпитопа, узнаваемого на поверхности домена D3, обеспечивает высокую вируснейтрализующую и протективную активность этого антитела (Baykov et al., 2014).

Заключение

Получены рекомбинатные фрагменты гликопротеина Е ВКЭ, штамм Софьин, и показано, что эпитоп, узнаваемый протективным антителом ch14D5a на поверхности гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита, расположен в области домена D3 и не перекрывается с доменами D1 и D2, содержащими эпитопы антител, обладающих повышенной способностью вызывать антителозависимое усиление инфекции. Полученные данные подтверждают перспективность использования антитела ch14D5a при создании терапевтического препарата против вируса клещевого энцефалита.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РНФ, проект № 17-74-10146.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Тикунова Н.В., Матвеев А.Л., Байков И.К., Хлусевич Я.А., Стронин О.В., Бондаренко Д.А., Мурашев А.Н. Результаты доклинического исследования препарата на основе химерного антитела против вирусного энцефалита. Труды Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН. Мед. вирусология. 2015;29(2):111. [Tikunova N.V., Matveev A.L., Baykov I.K., Khlusevich Y.A., Stronin O.V., Bondarenko D.A., Murashev A.N. Preclinical study of a preparation developed on the base of chimeric antibody against tick-borne encephalitis virus. Trudy Instituta Poliomiellita i Virusnykh Entsefalitov im. M.P. Chumakova RAMN. Meditsinskaya Virusologiya = Medical Virology (Moscow). 2015; 29(2):111. (in Russian)]
- Barba-Spaeth G., Dejnirattisai W., Rouvinski A., Vaney M.C., Medits I., Sharma A., Simon-Lorière E., Sakuntabhai A., Cao-Lormeau V.M., Haouz A., England P., Stiasny K., Mongkolsapaya J., Heinz F.X., Screaton G.R., Rey F.A. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. Nature. 2016;536(7614):48-53. DOI 10.1038/nature18938.
- Baykov I.K., Matveev A.L., Stronin O.V., Ryzhikov A.B., Matveev L.E., Kasakin M.F., Richter V.A., Tikunova N.V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. Vaccine. 2014; 32(29):3589-3594. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.05.012.
- Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. 2012;82(1):240-251. DOI 10.1016/j.pep.2011.10.009.
- Carrió M.M., Villaverde A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. J. Bacteriol. 2005;187(10):3599-3601.

- Chen Q. Plant-made vaccines against West Nile virus are potent, safe, and economically feasible. *Biotechnol. J.* 2015;10(5):671-680. DOI 10.1002/biot.201400428.
- Crill W.D., Hughes H.R., Delorey M.J., Chang G.J. Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One.* 2009;4(4):e4991. DOI 10.1371/journal.pone.0004991.
- Dai L., Song J., Lu X., Deng Y.Q., Musyoki A.M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C.F., Qi J., Gao G.F. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe.* 2016;19(5):696-704. DOI 10.1016/j.chom.2016.04.013.
- de Alwis R., Smith S.A., Olivarez N.P., Messer W.B., Huynh J.P., Wahala W.M., White L.J., Diamond M.S., Baric R.S., Crowe J.E., Jr., de Silva A.M. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(19):7439-7444. DOI 10.1073/pnas.1200566109.
- Dowd K.A., Pierson T.C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology.* 2011;411(2):306-315. DOI 10.1016/j.virol.2010.12.020.
- Elahi M., Islam M.M., Noguchi K., Yohda M., Toh H., Kuroda Y. Computational prediction and experimental characterization of a "size switch type repacking" during the evolution of dengue envelope protein domain III (ED3). *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1844(3):585-592. DOI 10.1016/j.bbapap.2013.12.013.
- Ershova A.S., Gra O.A., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Tkachuk A.P., Bartov M.S., Savina D.M., Sergienko O.V., Galushkina Z.M., Gudov V.P., Kozlovskaya L.I., Kholodilov I.S., Gmyl L.V., Karganova G.G., Lunin V.G., Karyagina A.S., Gintsburg A.L. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice. *BMC Infect. Dis.* 2016;16(1):544.
- Fink A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 1998;3(1):R9-23.
- Halstead S.B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol. Spectr.* 2014;2(6). DOI 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- Haslwanter D., Blaas D., Heinz F.X., Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS Pathog.* 2017;13(9):e1006643. DOI 10.1371/journal.ppat.1006643.
- Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(9):4101-4110.
- Jarmer J., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Vratskikh O., Strauß J., Aberle J.H., Chmelik V., Kundi M., Stiasny K., Heinz F.X. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J. Virol.* 2014;88(23):13845-13857. DOI 10.1128/JVI.02086-14.
- Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E., Mercado J.C., Kuan G., Gordon A., Balmaseda A., Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science.* 2017;358(6365):929-932. DOI 10.1126/science.aan6836.
- Kulkarni M.R., Numoto N., Ito N., Kuroda Y. Modeling and experimental assessment of a buried Leu-Ile mutation in dengue envelope domain III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;471(1):163-168. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.01.159.
- Lisova O., Hardy F., Petit V., Bedouelle H. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt.9):2387-2397.
- Maillard R.A., Jordan M., Beasley D.W., Barrett A.D., Lee J.C. Long range communication in the envelope protein domain III and its effect on the resistance of West Nile virus to antibody-mediated neutralization. *J. Biol. Chem.* 2008;283(1):613-622.
- Nybakken G.E., Oliphant T., Johnson S., Burke S., Diamond M.S., Fremont D.H. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature.* 2005;437(7059):764-769.
- Oliphant T., Engle M., Nybakken G.E., Doane C., Johnson S., Huang L., Gorlatov S., Mehlhop E., Marri A., Chung K.M., Ebel G.D., Kramer L.D., Fremont D.H., Diamond M.S. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.* 2005;11(5):522-530.
- Oliphant T., Nybakken G.E., Austin S.K., Xu Q., Bramson J., Loeb M., Throsby M., Fremont D.H., Pierson T.C., Diamond M.S. Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J. Virol.* 2007;81(21):11828-11839.
- Pierson T.C., Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr. Opin. Virol.* 2013;3(1):3-12. DOI 10.1016/j.coviro.2012.12.001.
- Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature.* 1995;375(6529):291-298.
- Rey F.A., Stiasny K., Vaney M.C., Dellarole M., Heinz F.X. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep.* 2018;19(2):206-224. DOI 10.15252/embr.201745302.
- Robinson L.N., Tharakaraman K., Rowley K.J., Costa V.V., Chan K.R., Wong Y.H., Ong L.C., Tan H.C., Koch T., Cain D., Kirloskar R., Viswanathan K., Liew C.W., Tissire H., Ramakrishnan B., Myette J.R., Babcock G.J., Sasisekharan V., Alonso S., Chen J., Lescaur J., Shriver Z., Ooi E.E., Sasisekharan R. Structure-guided design of an anti-dengue antibody directed to a non-immunodominant epitope. *Cell.* 2015;162(3):493-504. DOI 10.1016/j.cell.2015.06.057.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* 2003;59:141-175.
- Sánchez M.D., Pierson T.C., McAllister D., Hanna S.L., Puffer B.A., Valentine L.E., Murtadha M.M., Hoxie J.A., Doms R.W. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology.* 2005;336(1):70-82.
- Sun H., Chen Q., Lai H. Development of antibody therapeutics against flaviviruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;19(1). pii: E54. DOI 10.3390/ijms19010054.
- Tsekanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). *Virus Res.* 1993;30(1):1-16.
- Volk D.E., Chavez L., Beasley D.W., Barrett A.D., Holbrook M.R., Gorenstein D.G. Structure of the envelope protein domain III of Omsk hemorrhagic fever virus. *Virology.* 2006;351(1):188-195.
- Volk D.E., May F.J., Gandham S.H., Anderson A., Von Lindern J.J., Beasley D.W., Barrett A.D., Gorenstein D.G. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology.* 2009;394(1):12-18. DOI 10.1016/j.virol.2009.09.001.
- Vratskikh O., Stiasny K., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Jarmer J., Karer U., Roggendorf M., Roggendorf H., Allwinn R., Heinz F.X. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003458. DOI 10.1371/journal.ppat.1003458.
- Wahala W.M., Kraus A.A., Haymore L.B., Accavitti-Loper M.A., de Silva A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology.* 2009;392(1):103-113. DOI 10.1016/j.virol.2009.06.037.
- Wang J., Bardelli M., Espinosa D.A., Pedotti M., Ng T.S., Bianchi S., Simonelli L., Lim E.X.Y., Foglierini M., Zatta F., Jaconi S., Beltramello M., Camerini E., Fibriansah G., Shi J., Barca T., Pagani I., Rubio A., Broccoli V., Vicenzi E., Graham V., Pullan S., Dowall S., Hewson R., Jurt S., Zerbo O., Stettler K., Lanzavecchia A., Sallusto F., Cavalli A., Harris E., Lok S.M., Varani L., Corti D. A human B-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell.* 2017;171(1):229-241.e15. DOI 10.1016/j.cell.2017.09.002.

- Wang P., Yang X. Neutralization efficiency is greatly enhanced by bivalent binding of an antibody to epitopes in the V4 region and the membrane-proximal external region within one trimer of human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins. *J. Virol.* 2010;84(14): 7114-7123. DOI 10.1128/JVI.00545-10.
- White M.A., Liu D., Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D., Fox R.O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Langat virus envelope protein domain III. *Acta Crystallogr.* 2003; D59:1049-1051. DOI 10.1107/S0907444903004475.
- Wu K.P., Wu C.W., Tsao Y.P., Kuo T.W., Lou Y.C., Lin C.W., Wu S.C., Cheng J.W. Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J. Biol. Chem.* 2003;278(46): 46007-46013.
- Yang J., Zhang J., Chen W., Hu Z., Zhu J., Fang X., Yuan W., Li M., Hu X., Tan Y., Hu F., Rao X. Eliciting cross-neutralizing antibodies in mice challenged with a dengue virus envelope domain III expressed in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 2012;58(4):369-380. DOI 10.1139/w11-137.
- Zhao H., Fernandez E., Dowd K.A., Speer S.D., Platt D.J., Gorman M.J., Govero J., Nelson C.A., Pierson T.C., Diamond M.S., Fremont D.H. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell.* 2016;166(4):1016-1027. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.020.
- Zidane N., Dussart P., Bremand L., Bedouelle H. Cross-reactivities between human IgMs and the four serotypes of dengue virus as probed with artificial homodimers of domain-III from the envelope proteins. *BMC Infect. Dis.* 2013;13:302. DOI 10.1186/1471-2334-13-302.

Фенетический анализ *Populus nigra*, *P. laurifolia* и *P. × jrtyschensis* в зоне гибридизации

А.В. Климов¹, Б.В. Прошкин²

¹ Новокузнецкий институт (филиал) Кемеровского государственного университета, Новокузнецк, Россия

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Широкое распространение гибридизации в роде *Populus*, в том числе спонтанной, вызванной использованием культиваров, требует изучения изменчивости и наследования морфологических признаков гибридами для первичного отслеживания этих процессов. Анализ эндогенной, внутри- и межпопуляционной изменчивости выполнен на 533 особях в семи популяциях *P. nigra*, семи – *P. laurifolia* и четырех – *P. × jrtyschensis* бассейна реки Томи. На каждой особи на 15 листьях с укороченных побегов в средней части кроны исследовались: форма листовой пластинки, форма ее верхушки, основания и морфотип побегов. Предложен вариант использования биометрических показателей для геометрической оценки формы листовой пластинки видов тополя. Проведенный анализ показывает, что из исследованных признаков критерию фена не соответствует только форма пластинки, поскольку обычно представлена несколькими типами в кроне одного дерева. У всех изученных видов уровень их внутривидовой изменчивости значительно выше межвидовой. По нарастанию внутривидовой изменчивости по качественным признакам таксоны располагаются в следующем порядке: *P. nigra* < *P. laurifolia* < *P. × jrtyschensis*. Доля межвидовой изменчивости отличается у исследованных видов: *P. laurifolia* – 21.5 %, *P. nigra* – 13.8 %, *P. × jrtyschensis* – 8.0 %. Популяции *P. laurifolia* отличаются наибольшей межвидовой дифференцировкой, что, вероятно, связано с дизъюнктивным распространением вида в силу узкой специализации к условиям горных рек. Меньшая дифференциация у *P. nigra* обусловлена тем, что этот вид доминирует в топольниках бассейна р. Томи, его популяции не фрагментированы и связаны между собой обширным потоком генов. У *P. nigra* наблюдается увеличение разнообразия качественных признаков и фенотипов в популяциях, приуроченных к очагам гибридизации. Фактором, определяющим межвидовую дифференцировку у *P. × jrtyschensis*, является действие отбора, приводящего к преобладанию в популяциях гибридов F_1 , что ведет к резкому снижению межвидовой изменчивости.

Ключевые слова: *Populus*; гибриды; качественные признаки; морфологические маркеры; морфометрия; фенотипическое разнообразие.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Климов А.В., Прошкин Б.В. Фенетический анализ *Populus nigra*, *P. laurifolia* и *P. × jrtyschensis* в зоне гибридизации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):468-475. DOI 10.18699/VJ18.384

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Klimov A.V., Proshkin B.V. Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in the hybridization zone. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):468-475. DOI 10.18699/VJ18.384

УДК 633.878.32:575.222.7

Поступила в редакцию 27.10.2017

Принята к публикации 27.03.2018

© АВТОРЫ, 2018

Phenetic analysis of *Populus nigra*, *P. laurifolia* and *P. × jrtyschensis* in the hybridization zone

A.V. Klimov¹, B.V. Proshkin²

¹ Novokuznetsk Branch of Kemerovo State University, Novokuznetsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

A wide spread of hybridization in the genus *Populus*, including spontaneous, caused by the use of cultivars requires studying the variability and inheritance of morphological features by hybrids for the primary tracking of these processes. An analysis of endogenous, intra- and interpopulation variability was performed on 533 individuals in seven *P. nigra*, seven *P. laurifolia* and four *P. × jrtyschensis* populations of the Tom river basin. On each specimen on 15 leaves from short shoots in the middle part of the crown, the shape of the leaf blade, the shape of its apex, the base and the morphotype of the shoots were examined. The use of biometric indicators for geometric evaluation of the shape of a leaf blade of poplar species was proposed. The analysis shows that only the shape of the plate does not correspond to the criterion of a hair dryer, since it is usually represented by several types in the crown of one tree. In all species studied, the level of their intrapopulation diversity is much higher than the interpopulation diversity. Based on increase in intrapopulation variability by qualitative characteristics, the taxa are arranged in the following order: *P. nigra* < *P. laurifolia* < *P. × jrtyschensis*. The share of interpopulation diversity differs among the species studied as follows: 21.5 % in *P. laurifolia*, 13.8 % in *P. nigra*, and 8.0 % in *P. × jrtyschensis*. Populations of *P. laurifolia* are noted for the greatest interpopulation differentiation, which is probably due to a disjunctive distribution of the species due to narrow specialization to the conditions of mountain rivers. A lower differentiation in *P. nigra* is probably because this species dominates in the poplar tree forests of the Tom river basin, its populations are not fragmented and are linked by extensive gene flow. In *P. nigra*, an increase in the diversity of qualitative characteristics and phenotypes is observed in populations confined to foci of hybridization. The factor determining interpopulation differentiation in *P. × jrtyschensis* is the selection action leading to the predominance of F_1 hybrids in populations, which leads to a sharp decrease in interpopulation variability.

Key words: *Populus*; hybrids; qualitative features; morphological markers; morphometry; phenotypic diversity.

Широкое распространение гибридизации в роде *Populus* увеличивает морфологическое разнообразие и нередко затрудняет идентификацию таксонов. Последнее особенно актуально, поскольку использование адвентивных видов и культиваров в озеленении привело к массовому распространению спонтанной гибридизации (Meirmans et al., 2010; Thompson et al., 2010; Talbot et al., 2012; Vanden-Broeck et al., 2012; Roe et al., 2014; Hu et al., 2017). Опасность генетического загрязнения природных популяций аборигенных видов через неконтролируемое скрещивание и возможную последующую интрогрессию требует тщательного изучения изменчивости и наследования морфологических признаков при гибридизации у тополя. Лучшим методом идентификации гибридов является использование молекулярных маркеров, однако первичное отслеживание этих процессов в популяциях должно базироваться на данных фенетики, что позволит наметить дальнейшие пути их изучения.

В Сибири в зоне совместного произрастания *P. laurifolia* Ledeb. (секция *Tacamahaca* Mill.) и *P. nigra* L. (секция *Aigeiros* Lunell) происходит их естественная гибридизация с образованием гибридного таксона *P. ×jrtyschensis* Ch. Y. Yang. В ряде более ранних работ нами были изучены количественные и отдельные качественные признаки данных видов, а также асимметрия гибридизации в бассейне р. Томи (Климов, Прошкин, 2016, 2017; Прошкин, Климов, 2017а).

Цель настоящего исследования – выполнить анализ разнообразия качественных признаков по критериям «фена» у *P. nigra*, *P. laurifolia* и *P. ×jrtyschensis* в зоне естественной гибридизации.

Материалы и методы

Анализ изменчивости морфологических признаков выполнен в популяциях верхнего и среднего течения р. Томи (табл. 1). Томь – правый приток р. Оби (устье: высота 68 м, координаты: 56°50'00" N, 84°29'20" E). Берет начало на юге Кузнецкого Алатау в районе его сочленения с Абаканским хребтом (исток: высота 903 м, 53°39'05" N, 89°45'50" E). Бассейн реки располагается на границе Западно-Сибирской низменности и Алтае-Саянской горной страны. Долина верхнего течения р. Томи узкая (ширина не более 1 км), глубоко врезанная, с V-образным профилем. Склоны высокие, крутые. Средняя высота водосбора около 900 м. Амплитуды высот превышают 600 м. В окрестностях г. Междуреченска, при слиянии с р. Усой долина Томи расширяется до 3–4 км. В среднем течении, ниже г. Новокузнецка, Томь – типичная равнинная река, хотя отличается повышенными уклонами и скоростями течения. С западного склона Кузнецкого Алатау в нее впадают такие многоводные притоки, как реки Бельсу (длина 83 км), Уса (179 км), Верхняя, Средняя и Нижняя Терсь (95, 114 и 110 км соответственно), Тайдон (110 км) и др. Все они имеют горный характер, узкие долины, порожистые русла и быстрое течение (Жуков, 2012).

Распространенный в бассейне р. Томи тополь черный, или осокорь (*P. nigra*), приурочен преимущественно к равнинным и, в меньшей степени, к низкогорным районам, тогда как тополь лавролистной (*P. laurifolia*) тяготеет к горным участкам. В зоне совместного произрастания на-

блюдается их естественная гибридизация с образованием тополя иртышского – *P. ×jrtyschensis*. Гибридизация не носит массового характера и охватывает только отдельные участки, которые можно рассматривать как ее очаги. Изученные в бассейне Томи популяции тополя иртышского имеют как природное, так и антропогенное происхождение (Климов, Прошкин, 2017).

В качестве морфологических маркеров изучения внутривидовой структуры выбраны признаки, важные при идентификации рассматриваемых видов. Для каждой особи определили морфотип побегов и на 15 листьях, отобранных со средней части укороченных побегов, исследовали форму листовой пластинки, ее основание и верхушку. Листья отбирали со средней части кроны репродуктивно зрелых деревьев (Прошкин, Климов, 2017б).

На каждом листе обследованы следующие признаки (мм): L – длина листовой пластинки; D – максимальная ширина пластинки; P – длина черешка; A – расстояние между самой широкой частью листовой пластинки и ее основанием. Измерения основных морфометрических признаков проводили с помощью программы Axio Vision 4.8.2. В разных работах терминология, используемая для характеристики листа, нередко сильно различается, поэтому для описания и определения форм листовой пластинки руководствовались шаблонами Ал.А. Федорова и др. (1956) и полученными биометрическими показателями.

Анализ гербарных образцов и ряда литературных источников (Большаков, 1992; Коропачинский, Встовская, 2012) показал, что листья изученных видов тополя часто характеризуют как яйцевидно-треугольные. Поскольку подобная форма отсутствует в вышеуказанных шаблонах, то за точку ее выделения принята R1/2. Здесь следует пояснить, что привычная слуху биолога яйцевидная форма в начертательной геометрии рассматривается как фигура «овоид» – замкнутая коробовая кривая, имеющая одну ось симметрии и состоящая из двух опорных окружностей разного диаметра (Талалай, 2011). При этом R1 – радиус большей окружности. Точку R1/2 легко определить на листовой пластинке из отношения A/L (Правдин, 1964). Однако в практике изучения морфологии мы имеем дело не со строгими геометрическими фигурами, а с живыми переменными объектами, поэтому, опираясь на шаблоны Ал.А. Федорова и др. (1956), мы использовали для анализа формы листьев следующие диапазоны: <0.25 – треугольная; 0.25–0.35 – яйцевидно-треугольная; 0.35–0.45 – яйцевидная; 0.45–0.65 – эллиптическая; >0.65 – обратнояйцевидная.

Морфотипы побегов определяли путем изучения степени опушения побегов и листьев (табл. 2). Степень развития трихом исследовали с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10. Принадлежность особей к определенному фенотипу устанавливали по сочетанию морфологических качественных признаков.

Для проверки различий между видами и их гибридами по качественным признакам использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, приняв за критичный уровень значимость $p < 0.001$, и метод главных компонент. Оценку внутривидовой и межвидовой изменчивости осуществляли, используя обобщенные

Таблица 1. Исследованные популяции тополя

Название популяции	Геогр. координаты	Кол-во деревьев/листьев		
		<i>P. nigra</i>	<i>P. laurifolia</i>	<i>P. × jrtyschensis</i>
Верхнее течение р. Томи				
Бельсу	53°41'35" N, 88°22'44" E	–	30/450	–
Студеный Плес	53°39'49" N, 88°20'01" E	–	30/450	–
Вороний	53°66'10" N, 88°29'52" E	–	30/450	–
Чистенький	53°66'19" N, 88°28'56" E	30/450	–	–
Майзас	53°37'24" N, 88°12'48" E	30/450	30/450	39/585
Кийзак	53°72'27" N, 87°94'58" E	30/450	–	–
Швейник	53°48'34" N, 87°28'42" E	30/450	–	–
Карлык	53°49'21" N, 87°28'03" E	–	–	41/615
Среднее течение р. Томи				
Новокузнецк	53°49'04" N, 87°07'23" E	30/450	–	23/345
Казанково	53°99'08" N, 87°29'44" E	30/450	–	–
Славино	54°02'05" N, 87°22'55" E	30/450	–	–
Ерунаково	54°09'32" N, 87°47'45" E	–	30/450	–
Верхняя Терсь	54°13'00" N, 87°39'48" E	–	30/450	10/150
Средняя Маганакова	54°19'33" N, 87°58'57" E	–	30/450	–
Итого		210/3150	210/3150	113/1695

Таблица 2. Общая характеристика морфотипов побегов

Морфотип	Описание
<i>P. nigra</i>	
1Pn	Порослевые побеги по всей длине цилиндрические, укороченные побеги – лептобласты. Побеги и листья голые
2Pn	Так же, черешок листа у основания листовой пластинки опушен длинными отстоящими волосками
<i>P. laurifolia</i>	
1Pl	Порослевые побеги по всей длине ребристые, укороченные побеги – лептобласты и дискобласты. Побеги голые, черешок опушен редкими короткими волосками, листовая пластинка голая
2Pl	Так же, побеги и листья редко опушены длинными волосками
3Pl	Так же, побеги и листья густо опушены короткими волосками
<i>P. × jrtyschensis</i>	
1Pxj	Порослевые побеги по всей длине цилиндрические, укороченные побеги – лептобласты и дискобласты. Побеги и листья голые
2Pxj	Порослевые побеги на 1/2–1/3 длины ребристые, ниже цилиндрические, укороченные побеги – лептобласты и дискобласты. Побеги голые или редко опушенные, листья по жилкам редко опушены
3Pxj	Порослевые побеги по всей длине ребристые, укороченные побеги – лептобласты и дискобласты. Побеги густо опушены, листья по жилкам густо опушены

показатели, предложенные Л.А. Животовским (1991), В.П. Путенихиным и др. (2004), С.В. Боронниковой и др. (2009). Анализ разнообразия качественных признаков, удовлетворяющих критериям «фена», проводили согласно методическим рекомендациям А.И. Видякина (2004). Статистическую обработку выполняли с помощью программ Excel и SPSS 23.0.

Результаты

Выполненный однофакторный анализ показал, что исследованные виды достоверно различаются по изучаемым качественным признакам, что подтвердил анализ главных компонент. При этом на первую компоненту приходится 57.6 % всей изменчивости, на вторую – 22.0 %, на третью – 17.0 % и на четвертую – 3.4 %. С первым фактором тесно коррелируют форма верхушки листовой пластинки ($r = 0.94$, $p < 0.00001$) и морфотип побега ($r = 0.73$, $p < 0.00001$), со вторым связана форма листовой пластинки ($r = 0.85$, $p < 0.00001$), с третьим – форма основания ($r = 0.57$, $p < 0.00001$). У изученных таксонов различаются четыре формы листовой пластинки: треугольная, яйцевидно-треугольная, яйцевидная и эллиптическая. На эндогенном уровне можно наблюдать сразу несколько форм, но преобладает одна.

Для *P. nigra* характерны треугольные и яйцевидно-треугольные листья, последние преобладали во всех популяциях (78–96 %). Следует отметить, что у 70 % особей

осокоя с морфотипом 2Pn, отличающихся наличием опушения, встречаются пластинки неправильно ромбовидной формы. Они составляют от 7 до 20 % выборки, показатель A/L у них колеблется от 0.35 до 0.47, что соответствует листьям с яйцевидной формой пластинки, не характерной для *P. nigra*. Возникновение морфотипа 2Pn, вероятно, является следствием интрогрессии (Климов, Прошкин, 2017), и наблюдаемая разбалансировка формы листовой пластинки может служить ее морфометрическим маркером.

У *P. laurifolia* также обнаружено три формы листа: яйцевидно-треугольная, яйцевидная и эллиптическая. В большинстве изученных насаждений наиболее распространены яйцевидные листья (50–70 %). *P. × jrtyschensis* характеризуется наличием всех форм, отмеченных у родительских видов. В популяциях гибридов преобладают яйцевидно-треугольные листья (55–82 %), треугольные и эллиптические отличаются крайне низкой частотой встречаемости.

Самые низкие уровни изменчивости формы листовой пластинки на индивидуальном уровне наблюдаются у *P. nigra*, а наиболее высокие – у *P. laurifolia*. Популяции *P. × jrtyschensis* характеризуются промежуточными значениями (табл. 3 и 4).

На укороченных побегах в средней части кроны у всех листьев одного дерева всегда выражена только одна форма верхушки и основания листовой пластинки. Листья

Таблица 3. Изменчивость формы листовой пластинки и морфотипов побега в популяциях тополя, оцененная по индексу Животовского ($\mu \pm s_{\mu}$)

Популяция	Форма листовой пластинки	Форма основания пластинки	Форма верхушки пластинки	Морфотип побега
<i>P. nigra</i>				
Чистенький	1.347 ± 0.044	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.359 ± 0.170
Майзас	1.713 ± 0.033	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.988 ± 0.028
Кийзак	1.708 ± 0.033	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.597 ± 0.146
Швейник	1.844 ± 0.025	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.359 ± 0.170
Новокузнецк	1.776 ± 0.029	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.960 ± 0.051
Казанково	1.390 ± 0.043	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.359 ± 0.170
Славино	1.617 ± 0.037	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.495 ± 0.158
<i>P. laurifolia</i>				
Бельсу	2.374 ± 0.057	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.496 ± 0.204
Студеный Плес	2.289 ± 0.060	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.483 ± 0.206
Вороний	2.528 ± 0.051	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.768 ± 0.146
Майзас	2.772 ± 0.037	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.735 ± 0.155
Ерунаково	2.377 ± 0.057	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	2.732 ± 0.156
Верхняя Терсь	2.368 ± 0.057	1.960 ± 0.013	1.000 ± 0.000	2.647 ± 0.176
Средняя Маганаква	2.310 ± 0.059	1.798 ± 0.028	1.000 ± 0.000	2.765 ± 0.147
<i>P. × jrtyschensis</i>				
Майзас	1.990 ± 0.005	1.435 ± 0.037	1.594 ± 0.033	2.579 ± 0.166
Карлык	2.062 ± 0.056	1.890 ± 0.058	1.425 ± 0.036	2.380 ± 0.189
Новокузнецк	2.152 ± 0.074	2.262 ± 0.071	1.990 ± 0.007	2.390 ± 0.251
Верхняя Терсь	1.943 ± 0.117	1.597 ± 0.065	1.597 ± 0.065	2.893 ± 0.175

Примечание. μ – показатель внутривидового разнообразия Животовского; s_{μ} – ошибка показателя Животовского.

Таблица 4. Фенотипическое разнообразие внутри и между популяциями, по индексу Шеннона

Признак	H_{cm}	H_n	F_n	$F_{мп}$
<i>P. nigra</i>				
ФЛП	0.544	0.513	0.943	0.056
ФОП	0.000	0.000	0.000	0.000
ФВП	0.000	0.000	0.000	0.000
Мт	0.671	0.535	0.796	0.203
Среднее	0.304	0.262	0.862	0.138
<i>P. laurifolia</i>				
ФЛП	1.223	1.114	0.910	0.090
ФОП	0.836	0.404	0.483	0.517
ФВП	0.000	0.000	0.000	0.000
Мт	1.467	1.253	0.854	0.146
Среднее	0.881	0.692	0.785	0.215
<i>P. × jrtyschensis</i>				
ФЛП	0.962	0.864	0.898	0.102
ФОП	0.549	0.539	0.981	0.019
ФВП	0.821	0.671	0.817	0.183
Мт	1.185	1.170	0.987	0.013
Среднее	0.879	0.811	0.920	0.080

Примечание. ФЛП – форма листовой пластинки; ФОП – форма основания пластинки; ФВП – форма верхушки пластинки; Мт – морфотип побега; H_{cm} – индекс разнообразия для суммарной выборки; H_n – среднее значение индекса разнообразия выборки для популяций; F_n – индекс разнообразия выборки внутри популяций; $F_{мп}$ – индекс межпопуляционного разнообразия.

P. nigra во всех изученных популяциях имели исключительно удлинненно-остроконечную верхушку и клиновидное основание.

У *P. laurifolia* форма верхушки всех листьев заостренная. Варьирование формы основания листовой пластинки у данного вида в пределах изученной территории связано с наличием форм, отличных не только по рассматриваемому признаку, но и по окрасу коры (Прошкин, Климов, 2017в). Наиболее распространенная серокорая форма имеет округленно-клиновидное основание листовой пластинки, а приуроченная к популяциям среднего течения белокорая – сердцевидное.

Для *P. × jrtyschensis* характерна удлинненно-остроконечная верхушка и округленно-клиновидное основание, но отмечены также единичные особи с округлым и выемчатым основанием листьев. Наибольшие уровни изменчивости данных признаков наблюдаются в Новокузнецкой популяции (см. табл. 3).

Морфотип побега не варьирует на эндогенном уровне. Для большинства популяций *P. nigra* характерно доминирование морфотипа 1Pn, исключение составляют выборки Майзасская и Новокузнецкая, отобранные в смешанных насаждениях с *P. laurifolia* и *P. × jrtyschensis*. Доли морфотипа 2Pn в них составили 56.7 и 36.7 %.

Таблица 5. Внутрипопуляционное разнообразие качественных признаков и фенотипов тополя, по индексу Животовского

Популяция	μ_1	$S_{\mu 1}$	μ_2	$S_{\mu 2}$
<i>P. nigra</i>				
Чистенький	18.721	1.162	1.763	0.211
Майзас	22.230	1.368	2.238	0.303
Кийзак	20.891	1.288	2.588	0.370
Швейник	20.462	1.263	2.039	0.265
Новокузнецк	22.520	1.375	3.471	0.535
Казанково	18.880	1.171	1.763	0.211
Славино	20.201	1.248	1.923	0.243
<i>P. laurifolia</i>				
Бельсу	26.152	3.977	4.490	0.276
Студеный Плес	25.897	3.930	4.862	0.429
Вороний	27.604	4.247	3.383	0.146
Майзас	28.291	4.374	5.326	0.345
Ерунаково	30.415	4.659	5.745	0.220
Верхняя Терсь	30.980	4.764	6.786	0.220
Средняя Маганаква	30.514	4.677	5.683	0.245
<i>P. × jrtyschensis</i>				
Майзас	31.505	1.001	11.614	0.842
Карлык	30.780	1.101	7.447	0.645
Новокузнецк	35.141	1.568	6.563	0.410
Верхняя Терсь	31.618	2.134	4.721	0.131

Примечание. μ_1 – показатель внутрипопуляционного разнообразия Животовского качественных признаков; $S_{\mu 1}$ – ошибка μ_1 ; μ_2 – показатель внутрипопуляционного разнообразия Животовского по фенотипам; $S_{\mu 2}$ – ошибка μ_2 .

У *P. laurifolia* тоже прослеживается тенденция изменения соотношения морфотипов в очагах гибридизации. Так, в Майзасской и Верхне-Терсинской популяциях наблюдается резкое увеличение особей морфотипа 1P1 (до 60 и 66.7 % соответственно). В большинстве насаждений, расположенных вне очагов гибридизации, преобладают особи с редко опушенными длинными волосками побегами и листьями.

На всех пробных площадях у *P. × jrtyschensis* преобладает морфотип 2P×j. Наиболее низкая вариабельность по данному признаку у *P. nigra*. *P. laurifolia* и *P. × jrtyschensis* отличаются сходными уровнями изменчивости (см. табл. 3). Уровень внутрипопуляционного разнообразия по качественным признакам у изученных видов значительно выше межпопуляционного. Доля последнего составила у *P. laurifolia* – 21.5 %, *P. nigra* – 13.8 %, *P. × jrtyschensis* – 8.0 % (см. табл. 4).

Оценка внутрипопуляционной изменчивости по индексу Животовского показала, что *P. laurifolia* отличается более высоким полиморфизмом по числу фенотипов по сравнению с *P. nigra*. Наибольшее разнообразие характерно для популяций *P. × jrtyschensis* (табл. 5).

В Майзасской и Новокузнецкой популяциях *P. nigra*, приуроченных к очагам гибридизации, наблюдается

повышение разнообразия качественных признаков и фенотипов, что связано с увеличением доли особей с опушенными листьями (см. табл. 5). У *P. laurifolia* полиморфизм возрастает в популяциях среднего течения. Как уже отмечено ранее, это связано с появлением белокорых форм.

Обсуждение

Анализ изученных морфологических признаков на соответствие их критерию «фена» показывает, что к фенам можно отнести форму верхушки, форму основания листовой пластинки и морфотип побега, поскольку для них характерно отсутствие эндогенной изменчивости. Хотя форма листовой пластинки как признак не отвечает всем критериям выделения фенов, в частности альтернативности, при достаточной выборке она является важным показателем специфики изменчивости качественных признаков видов рода *Populus*. В целом форма основания и верхушки листа у *P. × jrtyschensis* представляют собой сочетание признаков родительских таксонов. Гибриды всегда наследуют характерные для видов секции *Tacamahaca* укороченные побеги – дискобласты. Вероятно, этот признак контролируется внеядерными генами (Прошкин, Климов, 2017г).

Высокая доля внутривидовой изменчивости отмечена рядом авторов у *P. nigra* (Šiler et al., 2014; Čortan et al., 2015; Jiang et al., 2015) и в целом у видов *Populus* (Joshi et al., 2011). Снижению межвидовой дифференциации у ветроопыляемых растений способствует большая дистанция потока генов (Зитте и др., 2007). У пойменных видов тополя также наблюдается значительный перенос семян водными потоками (Hidalgo et al., 2010). По нарастанию уровня внутривидовой изменчивости изученные виды располагаются в следующем порядке: *P. nigra* < *P. laurifolia* < *P. × jrtyschensis*.

Относительно небольшая доля межвидовой дифференциации у *P. nigra*, вероятно, связана также с тем, что этот вид доминирует в топольниках бассейна р. Томи, его популяции не фрагментированы и связаны между собой обширным потоком генов. У *P. nigra* наблюдается увеличение разнообразия качественных признаков и фенотипов в популяциях, приуроченных к очагам гибридизации.

P. laurifolia, напротив, как показали исследования этого вида, проведенные авторами на реках Томь, Бия и Катунь, имеет преимущественно дизъюнктивное распространение в северо-западной части Алтае-Саянской горной страны, что увеличивает долю межвидовых различий. Приуроченность к хорошо аэрируемому гравийно-валунному аллювию приводит к тому, что *P. laurifolia* отличается более узкой экологической амплитудой и встречается на многорукавных участках горных рек. Его распространение на равнины ограничено, на наш взгляд, низким содержанием кислорода в плотных песчано-илистых отложениях.

Тополь лавролистной распространен как в верхнем, так и в среднем течении р. Томи. На первом отрезке он довольно многочислен и часто образует насаждения, в среднем течении, где преобладает мелкий аллювий, *P. laurifolia* встречается очень редко, в виде единичных клонов. Его численность резко возрастает в поймах крупных горных

притоков (реки Верхняя и Средняя Терсь). Группа популяций *P. laurifolia* среднего течения Томи относительно изолирована от популяций верхнего, поскольку они не только удалены друг от друга (около 50 км), но и простираются реки на этих отрезках различно. В верхнем течении Томь течет с востока на запад, в среднем – с юга на север. С учетом господствующих направлений воздушных масс последнее обстоятельство исключает перенос пыльцы и оставляет лишь один вариант генетического потока, связывающий эти группы популяций, – транспорт семян водой, т. е. поток генов односторонний. Однако фрагментированные популяции *P. laurifolia* приурочены к поймам правых горных притоков р. Томи, и вопрос об эффективности этого потока генов требует отдельного исследования.

Наблюдаемое формовое разнообразие *P. laurifolia*, в частности распространение в популяциях горных притоков среднего течения р. Томи наряду с широко распространенной серокорой формой еще и белокорой, приводит к росту в них полиморфизма как качественных признаков, так и фенотипов. Работы различных авторов показывают, что пространственная дифференциация популяций у видов рода *Populus* определяется историческими процессами и, главным образом, событиями в плейстоцене и голоцене (Keller et al., 2010; Macaya-Sanz et al., 2012; Dewoody et al., 2015; Meirmans et al., 2017; Fan et al., 2018). Поэтому изменчивость популяционной структуры *P. laurifolia* в бассейне Томи – тема для отдельного исследования.

Теоретически наибольшим уровнем межвидовой различий должен характеризоваться *P. × jrtyschensis*, поскольку: 1) это наименее распространенный вид; 2) встречается только фрагментарно; 3) популяции удалены друг от друга на расстояние 20–100 км, что сильно ограничивает поток генов между ними. Однако фенотипическая структура популяций *P. × jrtyschensis* определяется крайне жестким действием естественного отбора, приводящего к преобладанию гибридов F_1 , с выбраковкой гибридов последующих поколений и беккроссов на ранних стадиях онтогенеза, до наступления репродуктивной зрелости (Jiang et al., 2016; Прошкин, Климов, 2017а). Все это приводит к резкому снижению межвидовой изменчивости.

Существенные различия по разнообразию фенотипов в исследованных популяциях *P. × jrtyschensis* определяются, на наш взгляд, их происхождением. Они возникают в местах нарушений растительного покрова, и в каждом конкретном месте факторы отбора и степень их давления индивидуальные. Популяция Майзасская и Карлык находятся в пойменных условиях, но первая возникла вследствие разрушения растительного покрова в результате эрозионно-аккумулятивной деятельности речного русла, вторая – в результате антропогенного воздействия. Популяция Верхняя Терсь находится под сильным воздействием факторов, связанных с динамикой русловых процессов. Река Верхняя Терсь – типично горная, отличается преобладанием гравийно-валунного аллювия. Условия здесь оптимальны для *P. laurifolia*, но неблагоприятны для *P. × jrtyschensis* и *P. nigra*, поэтому данная популяция гибридов самая малочисленная. Новокузнецкая популяция

имеет антропогенное происхождение, она расположена на надпойменной террасе, и если в природных популяциях основные абиотические факторы отбора связаны с динамикой русловых процессов, то здесь спектр неблагоприятных факторов, вероятно, шире.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Большаков Н.М. Salicaceae – Ивовые. Флора Сибири. Новосибирск: Наука, 1992;5:8-11. [Bol'shakov N.M. Salicaceae – Willow. In: Flora of Siberia. Novosibirsk: Nauka Publ., 1992;5:8-11. (in Russian)]
- Боронникова С.В., Тихомирова Н.Н., Кравченко О.А. Характеристика генофондов редкого лекарственного вида *Adonis vernalis* L. с использованием ISSR-маркеров. Аграр. вестн. Урала. 2009;5(59):67-70. [Boronnikova S.V., Tikhomirova N.N., Kravchenko O.A. Characterization of the gene pool of the rare medicinal species *Adonis vernalis* L. using ISSR markers. Agrarnyy Vestnik Urala = Agricultural Bulletin of the Urals. 2009;5(59):67-70. (in Russian)]
- Видякин А.И. Методические рекомендации по выделению фенотипов лесных древесных растений (на примере сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.)). Воронеж, 2004. [Vidyakin A.I. Methodical Recommendations on the Recognition of Phenotypes in Forest Woody Plants by the Example of *Pinus sylvestris* L. Voronezh, 2004. (in Russian)]
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. [Zhivotovskiy L.A. Population Biometrics. Moscow: Nauka Publ., 1991. (in Russian)]
- Жуков И.А. Реки Кемеровской области. Новокузнецк, 2012. [Zhukov I.A. Rivers of the Kemerovo Region. Novokuznetsk, 2012. (in Russian)]
- Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В., Брезенски А., Кернер К. Ботаника. Эволюция, систематика и филогения растений. М.: Изд. центр «Академия», 2007;3:58-67. [Sitte P., Weiler E.W., Kadereit Y.W., Bresinsky A., Körner C. Botany. In: Evolution, Systematics and Phylogeny of Plants. Moscow: Akademiya Publ., 2007;3:58-67. (in Russian)]
- Климов А.В., Прошкин Б.В. Морфологическая идентификация естественных гибридов *P. nigra* × *P. laurifolia* в пойме р. Томи. Сиб. лесн. журн. 2016;5:55-62. DOI 10.15372/SJFS20160506. [Klimov A.V., Proshkin B.V. Morphological identification of *Populus nigra* × *P. laurifolia* natural hybrids in the flood-plain of the Tom river. Sibirskiy Lesnoy Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science. 2016;5:55-62. DOI 10.15372/SJFS20160506. (in Russian)]
- Климов А.В., Прошкин Б.В. Морфотипическое разнообразие в популяциях *Populus nigra* L., *P. laurifolia* Ledeb. и *P. × jrtyschensis* Ch.Y. Yang в зоне естественной гибридизации. Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2017;39:58-72. DOI 10.17223/19988591/39/4. [Klimov A.V., Proshkin B.V. Morphotypic diversity in populations of *Populus nigra* L., *P. laurifolia* Ledeb., and *P. × jrtyschensis* Ch.Y. Yang in the zone of natural hybridization. Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology. 2017;39:58-72. DOI 10.17223/19988591/39/4. (in Russian)]
- Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012. [Koropachinskiy I.Yu., Vstovskaya T.N. Woody Plants of Asian Russia. Novosibirsk: Geo Publ., 2012. (in Russian)]
- Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. М.: Наука, 1964. [Pravdin L.F. Scotch Pine. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)]
- Прошкин Б.В., Климов А.В. *Populus × jrtyschensis* Chang Y. Yang в Алтае-Саянской горной стране. Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Том. гос. ун-та. 2017a;115:28-35. DOI 10.17223/20764103.115.5. [Proshkin B.V., Klimov A.V. *Populus × jrtyschensis* Chang Y. Yang in the Altai-Sayan mountain country. Sistematicheskie Zametki po Materialam Gerbariya Imeni P.N. Krylova Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Systematic Notes on the Materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University. 2017a;115:28-35. DOI 10.17223/20764103.115.5. (in Russian)]
- Прошкин Б.В., Климов А.В. Гибридизация *Populus nigra* L. и *P. laurifolia* Ledeb. (Salicaceae) в пойме реки Томи. Сиб. лесн. журн. 2017b;4:38-51. DOI 10.15372/SJFS20170404. [Proshkin B.V., Klimov A.V. Hybridization of *Populus nigra* L. and *P. laurifolia* Ledeb. (Salicaceae) in the floodplain of the Tom river. Sibirskiy Lesnoy Zhurnal = Siberian Journal of Forest Science. 2017b;4:38-51. DOI 10.15372/SJFS20170404. (in Russian)]
- Прошкин Б.В., Климов А.В. Изменчивость признаков листа у форм *Populus laurifolia* Ledeb., отличающихся по окрасу коры, в бассейне реки Томи. Вестн. Новосиб. гос. аграр. ун-та. 2017b;1:93-106. [Proshkin B.V., Klimov A.V. Variability of leaf shapes in *Populus laurifolia* Ledeb. varieties differing in bark color in the drainage area of the Tom River. Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University. 2017c;1:93-106. (in Russian)]
- Прошкин Б.В., Климов А.В. Спонтанная гибридизация *Populus × sibirica* и *Populus nigra* в городе Новокузнецке (Кемеровская область). Turczaninowia. 2017r;20(4):206-218. DOI 10.14258/turczaninowia.20.4.19. [Proshkin B.V., Klimov A.V. Spontaneous hybridization of *Populus × sibirica* and *Populus nigra* in the city of Novokuznetsk (Kemerovo region). Turczaninowia. 2017d;20(4):206-218. DOI 10.14258/turczaninowia.20.4.19. (in Russian)]
- Путенихин В.П., Фарукшина Г.Г., Шиганов З.Х. Лиственница Сукачева на Урале: изменчивость и популяционно-генетическая структура. М.: Наука, 2004. [Putenikhin V.P., Farukshina G.G., Shiganov Z.Kh. Sukachev Larch in the Urals: Variability and Population-Genetic Structure. Moscow: Nauka Publ., 2004. (in Russian)]
- Талалай П.Г. Начертательная геометрия на примерах. СПб.: БХВ-Петербург, 2011. [Talalay P.G. Descriptive Geometry through Examples. St. Petersburg: BKhV-Petersburg Publ., 2011. (in Russian)]
- Федоров Ал.А., Кирпичников М.Э., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. Лист. М.: Изд-во АН СССР, 1956. [Fedorov A.A., Kirpichnikov M.E., Artyushenko Z.T. Atlas on Descriptive Morphology of Higher Plants. Leaf. Moscow: AN SSSR Publ., 1956. (in Russian)]
- Čortan D., Tubić B., Šijačić-Nikolić M., Borota D. Variability of black poplar (*Populus nigra* L.) leaf morphology in vojvodina. Serbia Izvorni znanstveni članci = Original Scientific Papers Šumarski List. 2015;5(6):245-252.
- Dewoody J., Trewin H., Taylor G. Genetic and morphological differentiation in *Populus nigra* L.: isolation by colonization or isolation by adaptation? Mol. Ecol. 2015;24(11):2641-2655. DOI 10.1111/mec.13192.
- Fan L., Zheng H., Milne R.I., Zhang L., Mao K. Strong population bottleneck and repeated demographic expansions of *Populus adenopoda* (Salicaceae) in subtropical China. Ann. Bot. 2018;121(4):665-679. DOI 10.1093/aob/mcx198.
- Hidalgo E., Gonzalez-Martinez S.C., Lexer C., Heinze B. Conservation Genomics. In: Jansson S., Bhalerao R.P., Groover A.T. (Eds.). Genetics and Genomics of *Populus*. Ser. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Vol. 8. Springer, 2010;349-368. DOI 10.1007/978-1-4419-1541-2_15.
- Hu J., Zhang J., Chen X., Lv J., Jia H., Zhao S., Lu M. An empirical assessment of transgene flow from a *Bt* transgenic poplar plantation. PLoS One. 2017;12(1):e0170201. DOI 10.1371/journal.pone.0170201.
- Jiang D., Feng J., Dong M., Wu G., Mao K., Liu J. Genetic origin and composition of a natural hybrid poplar *Populus × jrtyschensis* from two distantly related species. Plant Biol. 2016;16(1):88-99. DOI 10.1186/s12870-016-0776-6.
- Jiang D., Wu G., Mao K., Feng J. Structure of genetic diversity in marginal populations of black poplar (*Populus nigra* L.). Biochem. Syst. Ecol. 2015;61:297-302. DOI 10.1016/j.bse.2015.06.014.
- Joshi C.P., DiFazio S.P., Kole Ch. (Eds.). Genetics, Genomics and Breeding of Poplar. CRC Press, 2011.

- Keller S.R., Olson M.S., Silim S., Schroeder W., Tiffin P. Genomic diversity, population structure, and migration following rapid range expansion in the Balsam Poplar, *Populus balsamifera*. *Mol. Ecol.* 2010;19(6):1212-1226. DOI 10.1111/j.1365-294X.2010.04546.x.
- Macaya-Sanz D., Heuertz M., Lopez-De-Heredia U., De-Lucas A.I., Hidalgo E., Maestro C., Prada A., Alia R., Gonzalez-Martinez S.C. The Atlantic-Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars. *Mol. Ecol.* 2012;21(14):3593-3609. DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05619.x.
- Meirmans P.G., Godbout J., Lamothe M., Thompson S.L., Isabel N. History rather than hybridization determines population structure and adaptation in *Populus balsamifera*. *J. Evol. Biol.* 2017;30(11):2044-2058. DOI 10.1111/jeb.13174.
- Meirmans P.G., Lamothe M., Gros-Louis M.C., Khasa D., Perinet P., Bousquet J. Complex patterns of hybridization between exotic and native North American poplar species. *Am. J. Bot.* 2010;97(10):1688-1697. DOI 10.3732/ajb.0900271.
- Roe A.D., MacQuarrie C.J., Gros-Louis M.C., Simpson J.D., Lamarque J., Beardmore T., Thompson S.L., Tanguay P., Isabel N. Fitness dynamics within a poplar hybrid zone: II. Impact of exotic sex on native poplars in an urban jungle. *Ecol. Evol.* 2014;4(10):1876-1889. DOI 10.1002/ece3.1028.
- Šiler B., Skorić M., Mišić D., Kovačević B., Jelić M., Patenković A., Kurbalija Novičić Z. Variability of European Black Poplar (*Populus nigra*) in the Danube Basin. Tomović Z., Vasić I. (Eds.). Petrovaradin: Vojvodinašume, 2014.
- Talbot P., Schroeder W.R., Bousquet J., Isabel N. When exotic poplars and native *Populus balsamifera* L. meet on the Canadian Prairies: Spontaneous hybridization and establishment of interspecific hybrids. *For. Ecol. Manage.* 2012;285:142-152. DOI 10.1016/j.foreco.2012.07.036.
- Thompson S.L., Lamothe M., Meirmans P.G., Perinet P., Isabel N. Repeated unidirectional introgression towards *Populus balsamifera* in contact zones of exotic and native poplars. *Mol. Ecol.* 2010;19(1):132-145. DOI 10.1111/j.1365-294X.2009.04442.x.
- Vanden-Broeck A., Cox K., Villar M. Natural hybridization and potential seed set of sympatric *Populus nigra* and *Populus × canadensis* along the river IJzer in Flanders (Belgium). *Plant Ecol. Evol.* 2012;145:341-349. DOI 10.5091/plecevo.2012.677.

Использование межвидовой гибридизации в селекции адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

А.И. Недолужко

Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Сорта хризантемы садовой, созданные в странах дальнего и ближнего зарубежья, южных регионах России, не всегда зимостойки на юге российского Дальнего Востока, повреждаются грибными болезнями в связи с избыточным увлажнением, запаздывают со сроками цветения, а следовательно, не могут претендовать на роль коммерческих. Перспективным направлением отечественной селекции хризантемы садовой является создание нового селекционного материала на основе использования природного генофонда рода *Chrysanthemum* с целью введения в культурные сорта ценных адаптивных признаков. Исследования проводили в Ботаническом саду-институте ДВО РАН с 2000 г. Исходя из биологических, генетических особенностей и обеспеченности природными ресурсами рода *Chrysanthemum*, нами предложена стратегия получения отечественных адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой с использованием межвидовой гибридизации. Объекты исследования – первые поколения межвидовых гибридов F_1 , ранее полученные автором в результате гибридизации сортов и многолетних маньчжурских и корейских высокогорных видов *Chrysanthemum*. Происходящие от разных видов и сортов гибриды F_1 скрещивали между собой для получения межгибридного потомства F_2 . Отбирали комплексно адаптивные (зимостойкие, устойчивые к *Puccinia horiana* Henn., ранозцветающие) и декоративные мультикомпонентные формы F_2 , которые привлекали в близкородственных скрещиваниях. Оценивали и отбирали потомство от близкородственных скрещиваний по адаптивным и декоративным показателям. Включение в селекционный процесс разных источников зимостойкости и устойчивости к *P. horiana* позволило усилить в F_2 и выявить в F_3 поколениях имеющиеся положительные качества. Адаптивные признаки диких видов *Chrysanthemum naktongense* Nakai, *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag., *C. leiophyllum* Nakai, *C. zawadzkii* subsp. *acutibolum* (DC.) Kitag., сформировавшиеся и закрепленные в процессе эволюции, наследовались и проявлялись в потомствах сложных межгибридных и близкородственных скрещиваний. Отобраны перспективные межвидовые и межгибридные формы с биологическими признаками, определяющими возможность возделывания в экстремальных условиях субрегиона.

Ключевые слова: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; дикие виды *Chrysanthemum*; межвидовая гибридизация; адаптивные признаки; российский Дальний Восток.

Use of interspecific hybridization in the breeding of adaptive hybrids and sorts of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

A.I. Nedoluzhko

Botanical Garden-Institute, Far East Branch RAS, Vladivostok, Russia

Many garden chrysanthemums bred across the world are not fully winter hardy. Many are damaged by fungal diseases due to a high humidity and are late flowering. This makes them unsuitable for general commercial marketing. Since 2000 we have been conducting a breeding program using natural species of the genus *Chrysanthemum* that are adapted to the local conditions. The strategy of breeding adaptive hybrids and varieties of chrysanthemum native to Russia was proposed based on their biological, genetic peculiarities and natural resources of *Chrysanthemum* with the use of interspecific hybridization. Research objects are the first generations of interspecific hybrids of F_1 obtained previously by the author as a result of the hybridization of varieties and wild species of *Chrysanthemum*. Derived from different species and varieties, F_1 hybrids were crossed among themselves to obtain the multicomponent F_2 progeny. F_2 seedlings with winter hardiness, resistance to *Puccinia horiana* Henn. and early flowering were used in closely related crosses. The offspring of F_3 from closely related crosses were also assessed and selected according to adaptive and decorative characteristics. Inclusion in the selection process of various sources of winter hardiness and resistance to *P. horiana* allowed positive characteristics to be increased in F_2 and to be revealed in F_3 . Adaptive signs of the wild species *Chrysanthemum naktongense* Nakai, *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag., *C. leiophyllum* Nakai, and *C. zawadzkii* subsp. *acutibolum* (DC.) Kitag., which have formed and fixed during evolution, were inherited and manifested in offspring of the multicomponent hybrids and the closely related crosses. Promising interspecific forms with biological signs determining the possibility of growing in extreme conditions of the subregion were selected.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; wild species *Chrysanthemum*; interspecific hybridization; adaptive features; Russian Far East.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Недолужко А.И. Использование межвидовой гибридизации в селекции адаптивных гибридов и сортов хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):476–483. DOI 10.18699/VJ18.385

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nedoluzhko A.I. Use of interspecific hybridization in the breeding of adaptive hybrids and sorts of garden chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):476–483. DOI 10.18699/VJ18.385 (in Russian)

УДК 575.222.72:582.998.2

Поступила в редакцию 30.12.2017

Принята к публикации 28.03.2018

© АВТОР, 2018

✉ e-mail: a.i.nedoluzhko@gmail.com

В мировом цветоводстве хризантема садовая (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) – одна из лидирующих культур в ландшафтном дизайне, топиарном искусстве, сезонной срезке. Однако интродуцированные в Россию сорта и полученное при межсортной гибридизации потомство характеризуются низким уровнем генетического разнообразия в отношении факторов, контролирующих устойчивость растений к действию биотических и абиотических стрессоров. Эффективный подход к расширению генетического разнообразия селекционных сортов основан на использовании ценных признаков диких родичей *Chrysanthemum*. В связи с поздним освоением дальневосточных ресурсов рода *Chrysanthemum* и удаленностью природного ареала от основных селекционных центров, природные виды *Chrysanthemum* до настоящего времени не востребованы российскими селекционерами для включения адаптивных признаков в геном культурных хризантем. В Государственном реестре селекционных достижений РФ пока отсутствуют районированные сорта хризантемы садовой, в генотип которых введены геномы или хромосомы диких видов *Chrysanthemum*.

Первые экспериментальные исследования и практические результаты по скрещиванию сортов и диких видов рода *Chrysanthemum* получены за рубежом. На генетической основе восточноазиатских многолетних видов *Chrysanthemum* еще в 30-х гг. прошлого столетия в США и Англии созданы уникальные по своим адаптивным и разнообразным декоративным характеристикам формы, имеющие промышленное значение (Kuykendall, Gale, 1949; Anderson, Gesick, 2003; Anderson, 2007; Anderson et al., 2008; Machin, 2012).

Успешную гибридизацию современных сортов хризантемы садовой (*C. morifolium* Ramat.) с индигенными субтропическими видами *C. shiwoigiku* Kitam., *C. pacificum* Nakai, *C. makino* Matsum. et Nakai, *C. nankingense* Hand.-Mazz., *C. indicum* L., *C. vestitum* (Hemsl.) Stapf, *C. chanetii* H. Lév., *C. zawadzkii* Herbach осуществляют в Японии, Китае с целью передачи генов, определяющих габитуальные особенности, устойчивость к белой ржавчине, листовому минеру, тле, абиотическим и техногенным факторам (Yamaguchi, 1981; Jong, Rademaker, 1989; Wang, Chen, 1990; Chen et al., 1995; Douzono, Ikeda, 1998; Suenaga et al., 1998; Cheng et al., 2010, 2011; Sun et al., 2010).

Прогресс в создании отечественных комплексно адаптивных сортов пока невелик. Выращиваемые в России хризантемы получены при свободном или межсортном опылении малозимостойких зарубежных садовых гибридов и сортов (Забелин, 1972; Козьменко, 2013; Тухваллина, Миронова, 2014) и требуют укрытия на зиму. Большинство их не обеспечено эффективными генами устойчивости к особо опасному карантинному патогену – белой ржавчине хризантем (*Puccinia horiana* Henn.): в период наблюдавшихся эпифитотий (2005, 2006, 2015, 2017 гг.) на коллекционных участках Ботанического сада-института выявлено только 34 % абсолютно устойчивых сортов (Недолужко, 2008а). Происходящая из субтропических районов Восточной Азии, обладающая высокой фотопериодической чувствительностью и требующая для закладки генеративных органов короткого светового дня, хризантема садовая задерживается со сроками цвете-

ния в умеренных широтах России, где продолжительный световой день и короткий вегетационный период.

Перспективным направлением отечественной селекции хризантемы садовой является создание нового селекционного материала на основе использования природного генофонда рода *Chrysanthemum* с целью интрогрессии в культурные сорта ценных адаптивных признаков.

Первые работы в России по использованию межвидовой гибридизации в селекции хризантемы садовой начаты автором в начале текущего столетия. Предбридинговые исследования представителей восточноазиатских многолетних видов *Chrysanthemum* показали, что очень немногие маньчжурские *C. naktongense* Nakai, 1909, Bot. Mag. (Tokyo), 23: 186; *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai, 1940, J. Jap. Bot. 16, 2: 74; и корейские высокогорные *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag., 1942, Rep. Inst. Sci. Res. Manchoukuo, 6: 129; *C. leiophyllum* Nakai, 1921, Bot. Mag. (Tokyo), 35: 147; *C. zawadzkii* subsp. *acutibulum* (DC.) Kitag., 1939, Rep. Inst. Sci. Res. Manchoukuo, 3, 2: 444 (Lin. Fl. Manshur.) выступают надежными комплексными источниками и донорами адаптивных признаков (устойчивость к *P. horiana*, зимостойкость, ранний срок цветения).

Многообразие аллелей диких видов *Chrysanthemum* при введении их в гибридизацию предполагает повышение гетерозиготности и, следовательно, создание не только специфической, но и комплексной адаптивности. Введение генов ценных признаков одного или нескольких дикорастущих представителей *Chrysanthemum* в геномный состав культурного сорта позволит совершенствовать генетическую основу последнего. Автором синтезированы первые межвидовые гибриды F_1 на основе культивируемых сортов (Вродлива, Линда, Хамелеон, Стелуца) и восточноазиатских многолетних видов (*C. naktongense*, *C. coreanum*, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum*, *C. leiophyllum*, *C. zawadzkii* subsp. *acutibulum*), которые совмещают в своем генотипе гены вида-донора, обеспечивающие устойчивость к болезням, выносливость к зимним экстремальным факторам, раннее цветение, легкую укореняемость, и качества высокодекоративного сорта-реципиента (Недолужко, 2010). Полученные сортовидовые гибриды F_1 показали возможность объединения геномов сортовых форм и природных видов *Chrysanthemum*, введения генетического материала на межгеномном уровне и явились новыми источниками адаптивных признаков. Дальнейшими скрещиваниями межвидовых гибридов F_1 с различным геномным составом и последующей близкородственной гибридизацией межгибридных форм F_2 мы рассчитываем объединить в новых организмах разнообразие доминантных генов устойчивости к *P. horiana*, отбраковать сеянцы с гомозиготным состоянием рецессивных аллелей восприимчивости к *P. horiana*, накопить рецессивные аллели генов, отвечающих за зимостойкость и другие адаптивные показатели (феноритм роста и развития, интенсивность возобновления), и тем самым получить эффективные источники и доноры для создания адаптивных сортов.

Цель работы – создать новый селекционный материал хризантемы садовой на основе межвидовой гибридизации с природными видами *Chrysanthemum*. В связи с этим поставлены следующие задачи: изучить возможность объе-

динения ценных признаков при скрещивании межвидовых гибридов F_1 между собой; провести близкородственные скрещивания полученных межгибридных форм F_2 для выявления ценных признаков; оценить и отобрать новые селекционные формы по комплексу адаптивных и декоративных показателей.

Материалы и методы

Исследования проводили в 2000–2017 гг. на территории Ботанического сада-института ДВО РАН, расположенного в прибрежной зоне юга Приморского края. Климат муссонный. Основные лимитирующие факторы: неустойчивость снежного покрова либо полное его отсутствие; сочетание низких зимних температур и интенсивной инсоляции при наличии сильных северных и северо-западных ветров, иссушающих почву и зимующие органы многолетних растений; теплое влажно-тропическое лето (в летний период выпадает до 85–90 % годового количества осадков), способствующее бурному развитию грибных патогенов (Бакланов, 2010).

Объектом изучения были первичные межвидовые гибриды F_1 , полученные автором путем искусственной гибридизации незимостойких сортов хризантемы садовой, различающихся восприимчивостью к *P. horiana* Henn., и комплексно адаптивных диких видов *Chrysanthemum*: Вродлива $\times$ *C. naktongense* Nakai; Вродлива $\times$ *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai; Вродлива $\times$ *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag.; Вродлива $\times$ *C. zawadzkii* subsp. *acutibolum* (DC.) Kitag.; Линда $\times$ *C. naktongense* Nakai; *C. naktongense* Nakai $\times$ Линда; Хамелеон $\times$ *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag.; Хамелеон $\times$ *C. leiophyllum* Nakai.

Происходящие от разных видов и сортов гибриды F_1 скрещивали между собой для получения межгибридного потомства F_2 . Отбирали комплексно адаптивные мультикомпонентные формы F_2 , которые привлекали в близкородственные скрещивания (беккроссы, сибсы, полусибсы). Гибридизацию (с предварительной изоляцией соцветий) осуществляли свежесобранной пылью однократно в период раскрытия большинства трубчатых цветков. Побеги с опыленными соцветиями срезали и дозаривали в сосудах с водой в необогреваемой теплице. Кастрацию не проводили, учитывая самонесовместимость хризантемы (Недолужко и др., 2002). Контроль – изоляция соцветий без опыления. Ревизию и обмолот семян проводили через один-два месяца после гибридизации, посев семян заканчивали в конце февраля–начале марта в условиях теплицы. В открытый грунт сеянцы высаживали с апреля по май. Генетическую совместимость определяли по результатам завязывания семян, всхожести и жизнеспособности сеянцев. В качестве критериев адаптивности растений учитывали зимостойкость, устойчивость к *P. horiana*, феноритмотип развития.

Отбор зимостойких генотипов проводили среди гибридных популяций после первой зимовки по особенностям весеннего восстановления после повреждающих зимне-весенних факторов по 5-балльной 6-ступенчатой шкале, где балл 0 – полное вымерзание растений, балл 5 – подмерзание отсутствует. Мониторинг зимостойкости отобранных сеянцев выполняли еще в течение ряда лет на высоких грядах без искусственного укрытия.

Отбор на устойчивость к *P. horiana* и другим грибным фитопатогенам (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Botrytis cinerea* Pers., *Septoria chrysanthemi-indici* Bubák & Kabát) проводили на естественном инфекционном фоне в период эпифитотий *P. horiana* (2005, 2006, 2015, 2017 гг.) с дополнительным заражением спорами *P. horiana* путем стряхивания их с пораженных листьев сильновосприимчивых сортов. Поражение растений белой ржавчиной оценивали по 4-балльной 5-ступенчатой шкале, где балл 0 соответствует отсутствию проявления признака, балл 4 – максимальному его выражению. Согласно полученному баллу, образцам присваивали литеры, обозначающие степень поражения патогеном (Коновалов, 2002).

В период массового цветения среди комплексно адаптивных потомков отбирали высокодекоративные сеянцы (Методика..., 1968, 2007). Элементами в оценке и отборе на декоративность служили начало, продолжительность и обилие цветения, размер и окраска соцветий, признаки вегетативной сферы (неполегаемость, компактность, степень облиственности). К перспективным сеянцам относили комплексно адаптивные с зимостойкостью 4–5 баллов, без малейших симптомов поражения грибными патогенами, цветущие в оптимальные сроки (сентябрь–октябрь). В период 2000–2017 гг. выполнено 38 комбинаций скрещиваний, опылено 239 соцветий, получено 5318 гибридных семян, выращен 1751 сеянец, выделено 72 перспективных отбора.

Результаты и обсуждение

Совместимость гибридов F_1 при гибридизации.

Получение F_2

Нашими экспериментами выявлена возможность скрещиваний первичных сортовидовых гибридов F_1 , но их эффективность была неодинаковой. Наиболее результативными по завязываемости семян и выживаемости сеянцев оказались комбинации сложных скрещиваний № 40-12, 43-12, 45-12, 46-12 (см. таблицу), имеющие в своем составе сорта Линда, Хамелеон и виды *C. naktongense*, *C. zawadzkii* var. *tenuisectum*, *C. leiophyllum*. Практически отсутствовали характерные для отдаленной гибридизации затруднения, гибридные семена в большинстве случаев завязывались нормально, проростки вполне жизнеспособны, сеянцы хорошо развиваются. В отдельных межгибридных семьях совмещение чужеродных геномов в новом организме вызвало низкую завязываемость семян, слабую их выполненность, плохую всхожесть и разного рода нарушения роста и развития сеянцев (хлорофильная недостаточность, бифуркации, фасциации побегов).

Преобладающее число потомков F_2 развивалось по сценарию диких родителей (Недолужко, 2008б). По сравнению с потомством F_1 , отличавшимся фенотипическим единообразием в пределах семьи (Недолужко, 2010), все изученные межгибридные комбинации F_2 увеличили размах изменчивости сеянцев по морфологическим признакам (общий габитус, степень облиственности, размер и окраска соцветий, срок цветения, энергия порослеобразования), а также обнаружили непрерывный ряд изменчивости по адаптивным показателям. У большинства сеянцев F_2 наблюдалось сочетание признаков культурных

Результаты межгибридных и близкородственных скрещиваний хризантемы садовой

Селек- ционный номер семьи	Родительские пары	♂		Опылено соцветий, шт.	Семян	Проанализировано сеянцев			
		♀				завязалось всего, шт.	на 1 соц., шт.	взошло, шт./%	в том числе перспек- тивных, шт./%
F ₂ = F ₁ × F ₁									
08-66	Линда × C. naktongense Nakai		Вродлива × C. coreanum (H. Lév. et Vaniot) Nakai	5	45	9.0	34/75.6	34	1/2.9
40-12	Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.		C. naktongense Nakai × Линда	9	621	69.0	265/42.7	241	8/3.3
43-12	Линда × C. naktongense Nakai		Хамелеон × C. leiophyllum Nakai	4	217	54.2	127/58.5	119	0/0
44-12	Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.		Линда × C. naktongense Nakai	4	49	12.2	12/24.5	8	0/0
45-12	C. naktongense Nakai × Линда		Хамелеон × C. leiophyllum Nakai	4	281	70.2	185/65.8	155	1/0.6
46-12	C. naktongense Nakai × Линда		Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	5	376	75.2	172/45.7	162	0/0
47-12	Хамелеон × C. leiophyllum Nakai		C. naktongense Nakai × Линда	5	62	12.4	3/4.8	3	0/0
69-12	Хамелеон × C. leiophyllum Nakai		Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	6	62	10.3	2/3.2	2	0/0
33-15	Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.		Вродлива × C. zawadzki subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	15	255	17.0	25/9.8	19	1/5.3
34-15	Вродлива × C. zawadzki subsp. acutilobum (DC.) Kitag.		Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	7	53	7.6	16/30.2	16	1/6.3
37-15	Линда × C. naktongense Nakai		Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	7	55	7.9	22/40.0	13	2/15.4
42-15	Вродлива × C. zawadzki subsp. acutilobum (DC.) Kitag.		Линда × C. naktongense Nakai	6	145	24.1	55/37.9	51	2/3.9
43-15	Линда × C. naktongense Nakai		Вродлива × C. zawadzki subsp. acutilobum (DC.) Kitag.	6	77	12.8	7/9.1	7	1/14.3
F ₃ HS ₁ (полусибсы)									
51-14	40-12*		46-12	3	87	29.0	14/16.1	14	0/0
52-14	46-12		40-12	2	62	31.0	12/19.3	12	1/8.3
44-13	C. naktongense Nakai × Линда		Линда × C. naktongense Nakai	6	240	40.0	88/36.7	52	1/1.9
58-12	Линда × C. naktongense Nakai		C. naktongense Nakai × Линда	3	257	85.7	88/34.2	86	0/0
50-14	Вродлива × C. naktongense Nakai		Вродлива × C. coreanum (H. Lév. et Vaniot) Nakai	2	111	55.5	85/76.6	19	7/36.8
41-15	Вродлива × C. zawadzki subsp. acutilobum (DC.) Kitag.		Вродлива × C. coreanum (H. Lév. et Vaniot) Nakai	4	–	–	30/–	20	1/5.0
50-15	Линда × C. naktongense Nakai		Вродлива × C. naktongense Nakai	4	15	3.8	6/40.0	6	1/16.7
52-15	Вродлива × C. zawadzki subsp. acutilobum (DC.) Kitag.		Вродлива × C. naktongense Nakai	4	–	–	45/–	42	1/2.4

Окончание таблицы

Селек- ционный номер семьи	Родительские пары	♂	Опылено соцветий,		Семян		Проанализировано сеянцев	
			шт.	шт.	завязалось всего, шт.	на 1 соц., шт.	взошло, шт./%	всего, шт. в том числе перспек- тивных, шт./%
F ₃ Вс ₁ (беккроссы)								
19-14	40-12	Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	4	320	80.0	86/26.9	77	3/3.9
56-15	45-12	C. naktongense Nakai × Линда	2	76	38.0	4/5.2	4	1/25.0
25-14	58-12	Линда × C. naktongense Nakai	3	233	77.7	70/30.0	61	1/1.6
26-14	(Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.) × Стелуца	Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	3	93	31.0	12/12.9	12	0/0
80-15	Линда × C. naktongense Nakai	08-66	7	128	18.3	14/10.9	14	1/7.1
11-16	(46-12) × (40-12)	40-12	16	185	11.6	22/11.9	16	1/6.2
16-16	(46-12) × (40-12)	46-12	14	296	21.1	75/25.3	75	16/21.3
F ₃ S ₁ (сибсы)								
72-15	45-12	45-12	13	61	4.7	12/19.7	6	1/16.7
77-15	08-66	08-66	11	95	8.6	21/22.1	15	1/6.7
76-15	08-66	08-66	11	95	8.6	21/22.1	19	0/0
42-14	40-12	40-12	6	124	20.7	6/4.8	6	0/0
40-14	(Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.) × Стелуца	(Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.) × Стелуца	2	50	25.0	27/54.0	23	0/0
18-16	19-14	19-14	6	3	0.5	1/33.3	1	0/0
17-16	46-12	46-12	8	5	0.6	2/66.7	1	1/100
15-16	52-14	52-14	12	86	7.2	11/12.8	4	1/25.0
Другие родственные								
40-16	Хамелеон × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.	Вродлива × (Вродлива × C. zawadzki var. tenuisectum Kitag.)	4	204	51.0	50/24.5	45	15/33.3
46-16	(Линда × C. naktongense Nakai) × Линда	Линда × C. naktongense Nakai	6	194	32.3	24/12.4	11	1/9.1

* Здесь и далее расшифровка в первом столбце.

сорт (прочность цветоносов, крупные соцветия, яркая окраска, длительность и обилие цветения) и диких видов *Chrysanthemum* (сильная облиственность генеративных побегов, интенсивное образование побегов возобновления, выносливость к природным стрессам). Отобраны гармонично развитые мультикомпонентные формы F_2 , указывающие на совместимость разных сортовых и видовых геномов в новом организме.

Зимостойкость гибридного потомства F_2

Культивируемые в России сорта хризантемы садовой, ведущие свое начало от субтропических видов *Chrysanthemum*, не имеют ясно выраженного периода глубокого покоя (побеги возобновления продолжают рост осенью при низких положительных температурах $+1 \dots +6^\circ\text{C}$) и, не обладая запасом зимостойкости, погибают в течение зимы. Виды *Chrysanthemum* умеренного климата, завершая рост побегов в сентябре–октябре, в ходе осеннего закаливания формируют определенный уровень зимостойкости и вступают в состояние органического покоя, сохраняя его на протяжении всего зимнего периода. Полученные на генетической основе диких видов гибриды F_1 отличаются повышенной устойчивостью к климатическим факторам, превосходят своих теплолюбивых сортовых родителей по зимостойкости (Недолужко, 2010).

Использование повторного рекомбинационного процесса – скрещивание гибридов F_1 между собой – позволило увеличить в поколении F_2 число выносливых семян и усилить выраженность признака зимостойкости. Среди межгибридного потомства F_2 выявлены формы, обладающие более длительным периодом глубокого зимнего покоя и замедленным темпом весеннего отрастания. Последовательно накапливая гены разных видов *Chrysanthemum*, нам удалось повысить биологический запас зимостойкости в межгибридных формах, обеспечить их адаптивность в экстремальных условиях. Наибольшее число зимостойких генотипов (до 54.5 %) отобрано в мультикомпонентных семьях на основе видов *C. naktongense*, *C. zawadzkyi* var. *tenuisectum*, *C. leiophyllum*. Наблюдения за ними в течение последующих трех–четырёх лет подтвердили высокую выносливость в суровом климате. Таким образом, введение в гибридизацию разных видов *Chrysanthemum* привело к накоплению полигенов зимостойкости хотя бы в единичных сеянцах F_2 либо способствовало другим сочетаниям в новых комбинациях, что позволило усилить имеющиеся положительные тенденции (положительные трансгрессии) или выявить нежелательные признаки и свойства.

Созданные на сложной генетической основе межгибридные формы F_2 служат новыми источниками зимостойкости для дальнейшей селекции на еще более высокий уровень устойчивости к низким температурам, а родительские межвидовые гибриды F_1 могут быть использованы в качестве доноров этого признака.

Устойчивость гибридного потомства F_2 к *P. horiana* Henn.

Доминирование признака устойчивости к белой ржавчине хризантем (Jong, Rademaker, 1986; Недолужко А.И., Недолужко А.В., 2010) и сравнительно простая его генетическая детерминация облегчают отбор в первом и последующих поколениях гибридов и возможность передачи эффектив-

ных генов диких видов *Chrysanthemum* в процессе селекционной работы. Анализ межгибридных популяций F_2 на устойчивость к *P. horiana* выявил наличие от 2.9 до 17.3 % (в зависимости от комбинации скрещивания) восприимчивых к белой ржавчине растений, что может свидетельствовать о достижении гомозиготности по рецессивным генам, определяющим восприимчивость к патогену, и гетерозиготности признака устойчивости у родительских форм F_1 , и/или перекомбинации факторов устойчивости.

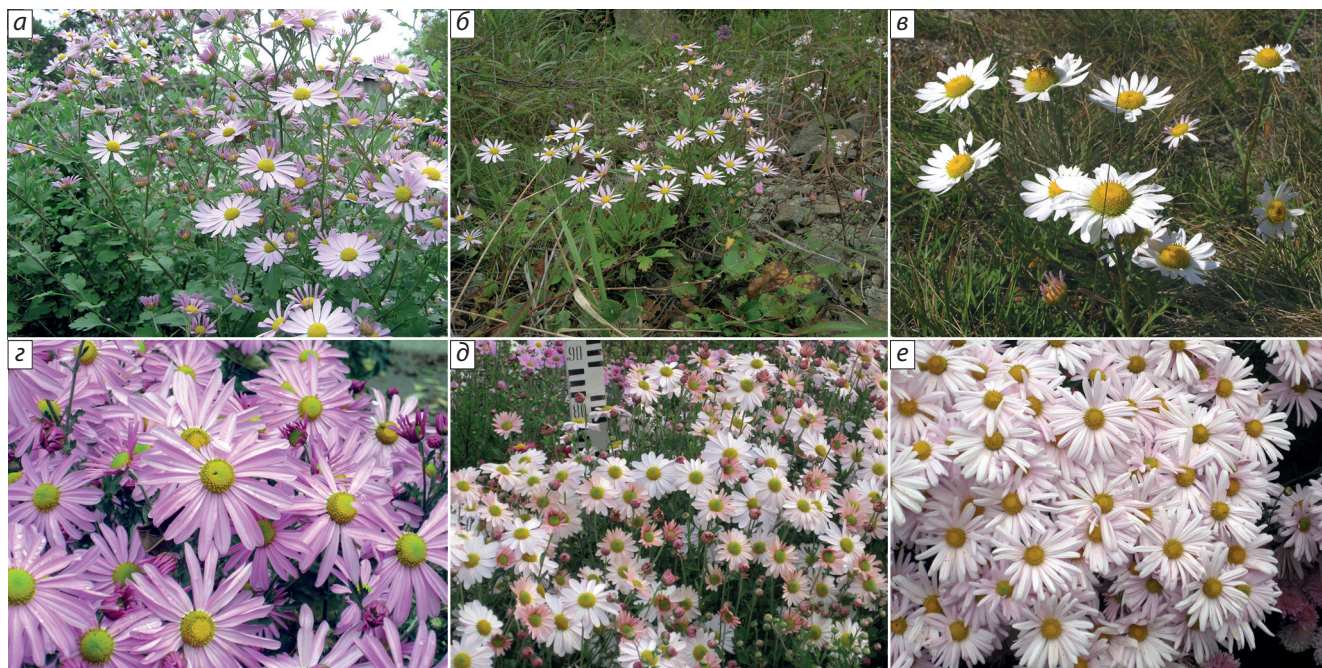
Феноритм тип роста и развития

Тип роста и скорость развития – важные факторы, влияющие на адаптивность растений, однако генетический контроль типа и скорости развития у хризантемы пока не изучен. Яровой тип развития (моноцикличность побегов), присущий субтропическим видам *Chrysanthemum* и созданным на их основе сортам хризантемы садовой (Недолужко, 2008б), возможно, связан с отсутствием генов зимостойкости, и наоборот, озимый тип развития (двцикличность побегов) видов умеренного климата определяется их наличием. В гибридном поколении F_2 наблюдается изменчивость потомства по типу развития и сроку цветения. Преобладающее число (72.3–87.8 %) семян развиваются по сценарию диких родителей (озимый тип): в первый год образуют приземную розетку листьев и уходят в зиму в фазе вегетативного клона. В генеративное состояние вступают на второй год роста (Недолужко, 2008б). Процессы подготовки растений к зиме начинаются задолго до окончания периода вегетации и зависят от температуры и длины дня, а фотопериодическая реакция тесно связана с их зимостойкостью. Зимостойкие виды *Chrysanthemum* умеренного климата раньше реагируют замедлением роста на сокращение длины дня осенью, в отличие от незимостойких субтропических представителей, продолжающих вегетировать до самых морозов, и передают свои качества гибриднему потомству.

По сроку вступления в генеративное состояние и фенодате «начало цветения» потомки F_2 представляют непрерывный ряд изменчивости от рано- до позднецветущих (с различной длительностью периода от начала вегетации до начала цветения). Отмечены сеянцы с неполным циклом развития (не успевшие достигнуть фазы цветения в связи с наступлением морозов, т.е. развивались как полужаровые–полуозимые). По особенностям расщепления можно предполагать высокую полигенность признака «начало цветения», что обеспечивает широкие возможности для отбора и сохранения нужного свойства в гибридах.

Были отобраны образцы, цветущие в оптимальные сроки на данной широте ($43^\circ 13' 27.48''$ с. ш., $131^\circ 59' 36.32''$ в. д.). Сравнение результатов наследования типа развития и фенологического ритма гибридов F_1 (Недолужко, 2010) и межгибридных форм F_2 (наст. исследование) предполагает некоторые тенденции эволюционного формирования признака как количественного, происходящего путем постепенного и длительного накопления отдельных изменений.

Скрещивание межвидовых гибридов F_1 показывает, что они хорошо передают свои ценные качества отдельным потомкам F_2 . Это позволяет считать их комплексными донорами таких признаков, как зимостойкость, устойчивость к *P. horiana*, ранний срок цветения, интенсивное



Виды и гибриды *Chrysanthemum*: а – *C. leiophyllum*; б – *C. nakdongense*; в – *C. coreanum*; г – F_2 ; д – F_1 ; е – F_3S_1 .

вегетативное возобновление. Выделенные в F_1 и F_2 поколениях источники и доноры ценных признаков послужили основными компонентами в схемах близкородственных скрещиваний.

Беккроссы, сибсы, полусибсы

Близкородственные скрещивания сложных межвидовых гибридов F_2 выявили в потомстве F_3 иммунные к *P. horiana* и выносливые к экстремальным факторам среды формы, что может свидетельствовать об успешной интрогрессии эффективных генов диких видов *Chrysanthemum* в полученный селекционный материал (см. таблицу). Отобраны комплексно адаптивные и декоративные сеянцы. Выявлены рекомбинантные формы с признаками сдержанного роста, продолжительным цветением.

Декоративность

Декоративность – важный интегральный показатель новых гибридов, который во многом зависит от их адаптации к комплексу неблагоприятных биотических и абиотических факторов, срока цветения, общей архитектоники растений, назначения использования. Среди комплексно адаптивных сеянцев F_2 и F_3 в качестве перспективных отобраны 72 высокодекоративные формы (см. рисунок), которые вегетативно размножены и находятся на разной стадии изучения (первичное, конкурсное сортоизучение). Мониторинг в течение трех-пяти лет выделенных в элиту и размноженных вегетативно отборов подтвердил стабильность проявления адаптивных показателей и позволил присвоить им статус сорта. Новые сорта Денница, Восточная Славянка, Звездная Россыпь, Лазурный Берег, Морская Пена, Северная Пацифика, Созвездие проходят государственное сортоиспытание.

По частоте возникновения в гибридных потомствах положительных трансгрессий – генотипов с комплексом

полезных признаков, совмещающих в одном организме устойчивость, зимостойкость, оптимальный срок цветения, определена селекционная ценность используемых родительских форм. Такими формами можно считать межвидовые F_1 гибриды: Вродлива $\times$ *C. coreanum* (H. Lév. et Vaniot) Nakai; Вродлива $\times$ *C. zawadzkii* subsp. *acutilobum* (DC.) Kitag.; Линда $\times$ *C. nakdongense* Nakai; *C. nakdongense* Nakai $\times$ Линда; Хамелеон $\times$ *C. zawadzkii* var. *tenuisectum* Kitag.; Хамелеон $\times$ *C. leiophyllum* Nakai.

Таким образом, межвидовая гибридизация хризантемы садовой позволила расширить спектр изменчивости, обогатить селекционный генофонд новыми полезными признаками и свойствами (совместить и повысить требуемый уровень зимостойкости с устойчивостью к *P. horiana*). Созданные более совершенные формы хризантемы садовой на новой генетической основе, проверенные в условиях всевозможных природных катаклизмов российского Дальнего Востока, уже сейчас являются ценнейшим исходным материалом для получения зимостойких, иммунных, высокодекоративных сортов и для других регионов России.

Заключение

Определена успешность скрещивания первичных межвидовых гибридов F_1 с разной генетической основой. Совмещение аллелей разных видов и сортов *Chrysanthemum* способствовало созданию мультикомпонентных гибридных форм F_2 с комплексом важных признаков и свойств, появлению положительных трансгрессий, дающих возможность перейти на более высокий уровень адаптивных признаков и рассчитывать на новые трансгрессии. Путем близкородственных скрещиваний межгибридных форм F_2 удалось существенно повысить частоту выпячивания трансгрессивных генотипов.

Предложенная стратегия заключается в накоплении адаптивных полигенов в сложных межвидовых комплек-

сах с последующим выявлением их при близкородственных скрещиваниях.

Проведенные исследования позволили выйти на качественно новый уровень создания отечественных гибридов и сортов хризантемы садовой, совмещающих иммунитет к *P. horiana* Henn., устойчивость к экстремальным зимним факторам, оптимальные сроки цветения, интенсивность вегетативного возобновления и высокую декоративность. Это способствует расширению адаптивного сортимента для активно формирующегося отечественного цветочного рынка.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в 2009–2010 гг. (проект № 09-04-98526-р_восток_a), Дальневосточного отделения РАН в 2014 г. (проект № 14-III-Д-06-039). Автор благодарит рецензентов за ценные замечания.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Бакланов П.Я. (ред.). Прибрежно-морское природопользование: теория, индикаторы, региональные особенности. Владивосток, 2010. [Baklanov P.Ia. (Ed.). Coastal-Marine Management: Theory, Indicators, Regional Differences. Vladivostok, 2010. (in Russian)]
- Забелин И.А. Выведение новых сортов хризантем. Труды Никит. ботан. сада. 1972;2(59):11-19. [Zabelin I.A. Breeding new varieties of chrysanthemums. Trudy Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Works of the State Nikita Botanical Gardens. 1972;2(59):11-19. (in Russian)]
- Козьменко Н.П. Результаты исследований по интродукции и селекции мелкоцветковых хризантем в субтропиках России. Субтропическое и декоративное садоводство. 2013;49:170-178. [Koz'menko N.P. Results of studies on the introduction and breeding of small-flowered chrysanthemums in the subtropical zone of Russia. Subtropicheskoe i Dekorativnoe Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2013;49:170-178. (in Russian)]
- Коновалов Ю.Б. Селекция растений на устойчивость к болезням и вредителям. М., 2002. [Konovalov Y.B. Plant Breeding for Resistance to Diseases and Pests. Moscow, 2002. (in Russian)]
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М., 1968. Вып. 6. Декоративные культуры. [Methodology of state trials of crop varieties. Moscow, 1968. Vol. 6. Ornamental Plants. (in Russian)]
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Хризантема. Офиц. бюл. Гос. комиссии РФ по испытанию и охране селекционных достижений. 2007;10:976-1002. [Methods of tests for distinctness, uniformity and stability: Chrysanthemum. The Official Newsletter of the State Commission of the Russian Federation for Testing and Protection of Breeding Achievements. 2007;10:976-1002. (in Russian)]
- Недолужко А.И. Оценка сортов, видов и гибридов хризантемы садовой на устойчивость к белой ржавчине. Вестн. РАСХН. 2008a;2:56-58. [Nedoluzhko A.I. Evaluation of varieties, species, and hybrids of hardy garden mums for resistance to white rust. Vestnik RASKhN = Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2008a;2:56-58. (in Russian)]
- Недолужко А.И. Онтогенетические особенности представителей рода *Chrysanthemum* (Asteraceae) в условиях интродукции на юге Приморья. Растит. ресурсы. 2008b;44(4):1-11. [Nedoluzhko A.I. Ontogenetic features of *Chrysanthemum* (Asteraceae) species under cultivation in the southern Primorye. Rastitelnye Resursy = Plant Resources. 2008b;44(4):1-11. (in Russian)]
- Недолужко А.И. Перспективы использования диких родичей в адаптивной селекции хризантемы садовой. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2010;11:43-50. [Nedoluzhko A.I. Prospects for the use of wild relatives in the adaptive selection of hardy garden mum. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2010;11:43-50. (in Russian)]
- Недолужко А.И., Дудкин Р.В., Фадеев К.Е. Цветение и опыление природных видов дендрантем в культуре: Роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия: Материалы междунар. конф. Ростов-н/Д, 2002;217-218. [Nedoluzhko A.I., Dudkin R.V., Fadeev K.E. Flowering and pollination of *Dendranthema* species by cultivation. Proceedings of the International Conference "Role of botanical gardens in biodiversity preservation". Rostov-on-Don, 2002;217-218 (in Russian)]
- Недолужко А.И., Недолужко А.В. Наследование устойчивости к белой ржавчине в гибридном потомстве хризантемы садовой. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2010;6:50-56. [Nedoluzhko A.I., Nedoluzhko A.V. The inheritance of resistance to white rust in hybrid progeny of hardy garden mum. Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Sciences. 2010;6:50-56. (in Russian)]
- Тухватуллина Л.А., Миронова Л.Н. Интродукция и селекция хризантемы корейской в Башкортостане. Уфа, 2014. [Tukhvatullina L.A., Mironova L.N. Introduction and Breeding of Korean Chrysanthemum in Bashkortostan. Ufa, 2014. (in Russian)]
- Anderson N.O. Chrysanthemum. *Dendranthema* × *grandiflora* Tzvel. In: Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges, and Opportunities for the 21st Century. Dordrecht: Springer, 2007;389-437.
- Anderson N., Ascher P., Gesick E. Winter-hardy Mammoth™ series garden chrysanthemums 'Red Daisy', 'White Daisy', and 'Coral Daisy' sporting a shrub plant habit. Hort. Science. 2008;43(3):648-654.
- Anderson N.O., Gesick E. Container production of prostrate garden chrysanthemums. Hort. Science. 2003;38(7):1344-1348.
- Chen J.Y., Wang S., Wang X., Wang P. Thirty years' studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars. Acta Hort. 1995;404:30-36.
- Cheng X., Chen S., Chen F., Deng Y., Fang W., Tang F., Liu Z., Shao W. Creating novel chrysanthemum germplasm via interspecific hybridization and backcrossing. Euphytica. 2011;177:45-53.
- Cheng X., Chen S., Chen F., Fang W., Deng Y., She L. Interspecific hybrids between *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Kitam. and *D. nankingense* (Nakai) Tzvel. achieved using ovary rescue and their cold tolerance characteristics. Euphytica. 2010;172:101-108.
- Douzono M., Ikeda H. All year round productivity of F₁ and BC₁ progenies between *Dendranthema grandiflorum* and *D. shiwogiku*. Acta Hort. 1998;452:303-310.
- Jong J. de., Rademaker W. The reaction of Chrysanthemum cultivars to *Puccinia horiana* and the inheritance of resistance. Euphytica. 1986;35:945-952.
- Jong J. de, Rademaker W. Interspecific hybrids between two *Chrysanthemum* species. Hort. Science. 1989;24(2):370-372.
- Kuykendall J.R., Galey D.O. The role of the Korean hybrids in the development of the new hardy garden chrysanthemums. Missouri Bot. Gard. Bull. 1949;37(8):161-178.
- Machin B. The origins of hardy border chrysanthemums. Plantsman. 2012;3:20-23.
- Suenaga H., Ikeda H., Hamamura T., Douzono M., Onozaki T. Evaluation of *Dendranthema* and related species in Japan for resistance to *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Abst. EUCARPIA 19th Int. Symp., Improvement of Ornamental Plants. France, 1998;23.
- Sun C.Q., Chen F.D., Teng N.J., Liu Z.L., Fang W.M., Hou X.L. Interspecific hybrids between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *C. indicum* (L.) Des Moul. and their drought tolerance evaluation. Euphytica. 2010;174:51-60. DOI 10.1007/s10681-009-0005-6.
- Wang P., Chen J. Studies on breeding ground-cover chrysanthemum new cultivars. Acta Hort. Sinica. 1990;17(3):223-228.
- Yamaguchi T. Chrysanthemum breeding for resistance to white rust. Japan. J. Breed. 1981;31:121-132.

Monitoring of *Aegilops* L. local species genetic diversity of Kazakhstan's flora

R. Urazaliev¹, M. Yessimbekova¹✉, K. Mukin¹, A. Chirkin², G. Ismagulova²

¹ Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture and Plant Growing, Almaty, Kazakhstan

² M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

Cereal Crop Wild Relatives (CWR) are a very important gene pool for cereal/wheat improvement. New genes for resistance to diseases and pests are urgently needed to avoid using pesticides and to raise adaptivity to the environmental stresses caused by global climate change. In this regard, the study is aimed at *ex situ* conservation of *Aegilops* L. genus local ecotypes' genetic diversity, which is very relevant and promising for breeding. In order to establish breeding utility and form an *ex situ* collection reflecting the intra- and inter-specific diversity, the phenotypic screening of Kazakhstan's local populations of *Aegilops* L. genus (*Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*) was conducted on the basis of multiple indicators. For the first time molecular-genetic analysis of 50 representatives of *Aegilops* L. genus from Kazakhstan's flora was performed. The microsatellite analysis with the use of 11 EST-SSR markers revealed eight of them to be most effective. For each marker, allele frequency and average heterozygosity was calculated. For the most informative markers the presence of 5 and 6 respective allelic variations was found. A bank of genomic DNA was created and kept in *ex situ* storage (–70 °C, long-term) in the IMBB of the MES of RK.

Key words: *Aegilops* L.; local population; phenotyping; molecular genetic analysis.

Мониторинг генетического разнообразия местных популяций рода *Aegilops* L. флоры Казахстана

Р. Уразалиев¹, М. Есимбекова¹✉, К. Мукин¹, А. Чиркин², Г. Исмагулова²

¹ Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Алматы, Казахстан

² Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

Дикие сородичи – это таксоны диких растений, относящиеся к культурам, которые потенциально могут использоваться в качестве доноров генов многих полезных признаков, улучшая урожайность и/или качество, помогая избежать применения пестицидов и повышая адаптивность растений к экологическим стрессам в условиях глобального изменения климата. В этой связи актуальны исследования, направленные на сохранение и изучение генетического разнообразия местных экотипов рода *Aegilops* L. Проведен скрининг казахстанских местных популяций рода *Aegilops* L. (*Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis*, *Ae. crassa*) для формирования коллекции *ex situ*, отражающей меж- и внутривидовое разнообразие. Мониторинг проведен на основе нескольких индикаторов для установления селекционной полезности (фенология, продуктивность, устойчивость к стрессам абиотического и биотического характера). Идентифицированы источники устойчивости к болезням, раннеспелости. Впервые выполнен молекулярно-генетический анализ 50 представителей рода *Aegilops* L. казахстанской флоры. Микросателлитный анализ выявил наиболее информативные EST-SSR маркеры (пять и шесть аллельных вариантов), была рассчитана частота аллелей и средняя гетерозиготность. Создан банк геномной ДНК для хранения *ex situ* (–70 °C).

Ключевые слова: *Aegilops* L.; местные популяции; фенотипирование; молекулярно-генетический анализ.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Urazaliev R., Yessimbekova M., Mukin K., Chirkin A., Ismagulova G. Monitoring of *Aegilops* L. local species genetic diversity of Kazakhstan's flora. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):484-490. DOI 10.18699/VJ18.386

УДК 576:631.527(574)

Поступила в редакцию 12.12.2017

Принята к публикации 28.04.2018

© АВТОРЫ, 2018

Crop Wild Relatives (CWR) are wild plant taxa related to crops that have a potential use as gene donors as they possess many beneficial traits conferring pest and/or disease resistance, improve yield or quality. These traits can be bred into cereal crops to meet changing environmental or market demands. CWR have greater intrinsic genetic diversity due to their wide adaptation to a variety of habitats (Maxted, Kell, 2009; Maxted et al., 2012, 2013). Wild species are unique genetic resources especially for corresponding cultivated species, but in general sense, even distantly related species can serve as good gene donors of target characteristics. Many populations and localized sub-specific taxa of CWR are severely endangered by human activities such as overgrazing, especially in arid regions and by industrial and construction activities. It must be a responsibility of each country to take measures for their sustainable conservation (Holubec, 2005, 2010a, b). CWR represent a very important gene pool for cereal improvement. New genes for resistance to diseases and pests are urgently needed to avoid using pesticides and to raise adaptivity to environmental stresses in connection with global climate change. *Aegilops* L. genus is closely related to the cultivated wheat (donor of B and D genomes) and has an important potential for improving wheat resistance to various biotic and abiotic stresses. Many regions in Kazakhstan, rich in CWR, are severely endangered by human activities. Local ecotypes of *Aegilops* L. genus are often used in Kazakhstan as a grazing culture that may lead to in their complete destruction (Sitpaeva et al., 2004; Yessimbekova et al., 2004, 2017; Urzaliev et al., 2007; Alimgazinova, Yessimbekova, 2013). Long-term expeditions helped to collect more than

200 local ecotypes of *Aegilops* L. genus species. The lack of knowledge about the phenotypic and genetic diversity of the collected germplasm was a serious obstacle for its rational use in bread wheat programs and preservation *ex situ*. More comprehensive knowledge is required to identify the potential sources of their useful traits.

The present study investigates the diversity of four local species – *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*. The results reveal the variation of agronomic traits, resistance to abiotic and biotic stresses, and genetic diversity of the collected germplasm. This data will be useful in future cultivation and breeding of domesticated wheat, especially where the goal is to increase adaptability of wheat in diverse environmental conditions. The goals of the study included: (1) phenotypic screening of agronomic traits diversity; (2) assessment for resistance to rust (yellow, brown, stem) on the artificial background; and (3) creation of genomic DNA bank for long term *ex situ* storage.

Materials and methods

Four provinces in North Kazakhstan, two provinces in West Kazakhstan, two provinces in South Kazakhstan, and South-Eastern Kazakhstan were surveyed for collecting the accessions. During the expeditions, a collection of more than 200 accessions of *Aegilops* L. was formed. The present study involves 50 accessions (local ecotypes) of four species *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa* from South and South-Eastern Kazakhstan. The geographical distribution of these four *Aegilops* L. species is shown in Fig. 1 (GPS data, MAPSOURCE program, USA).

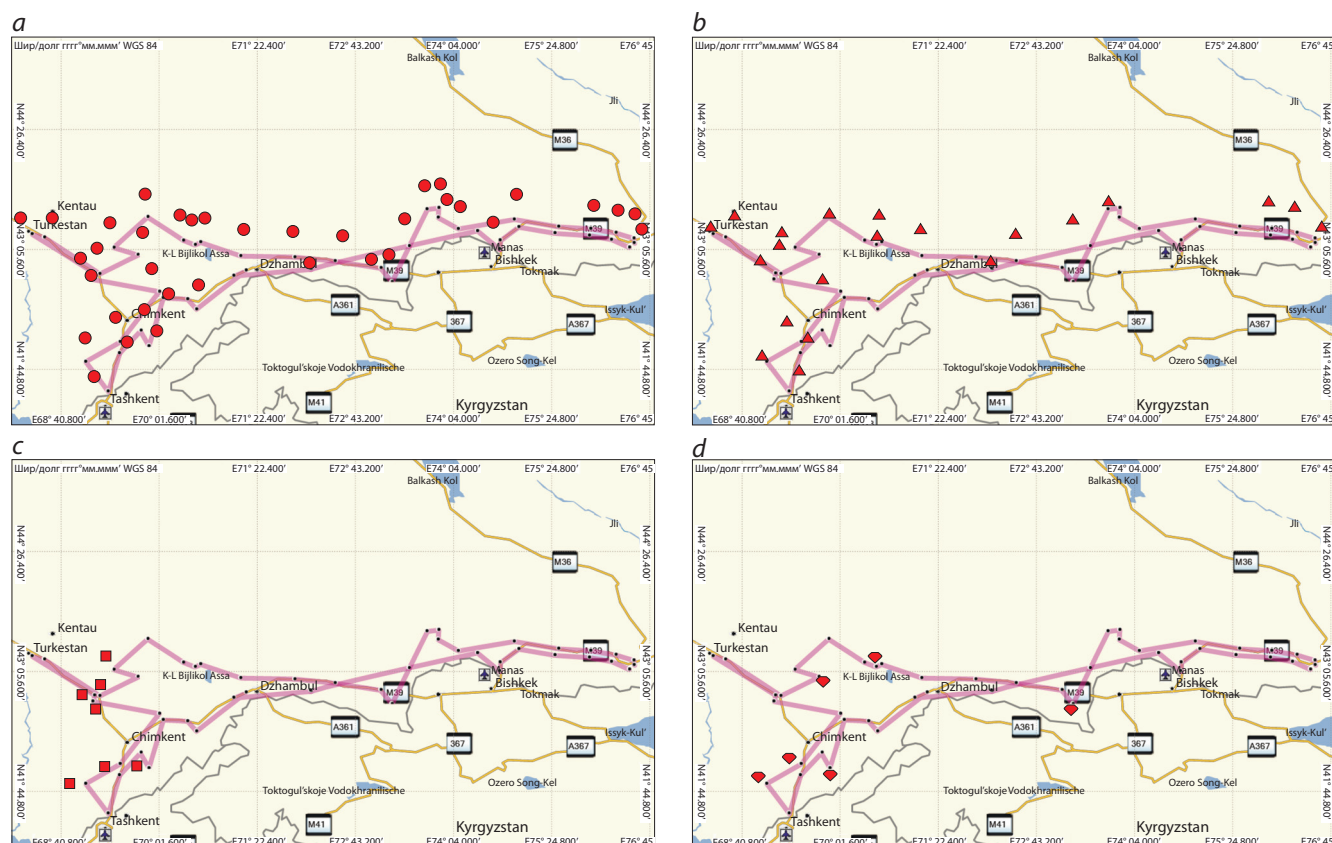


Fig. 1. Maps of four local *Aegilops* L. species distribution: a – *Ae. cylindrica*; b – *Ae. tauschii*; c – *Ae. crassa*; d – *Ae. triuncialis*.

Table 1. Sequences of EST-STS markers

Marker	Sequence (5'→3')	Annealing temperature, °C
PK1	F – GCCTTCGCCACCAACTTC R – CACGACGTACAAGTACACATGC	53
PK3	F – TTGCTGAGGTGGTGTTCCT R – TAAGGGCTCCTCAAGCTCCT	51
PK5	F – GAGGCGGCCTACAAGAAGAT R – GAGGCGGCCTACAAGAAGAT	51
PK8	F – GCTAGCAACCAGAGACTCAC R – GTCGTCCTCGCTGTTGTTG	50
PK9	F – GTCCAGCTCTCGGTAATTGG R – TGCATCCAAACAAGCCATGC	49
PK29	F – TACTAGAGGAGATGCAGACG R – TGGCAATAGCCTGAACCACT	52
PK18	F – AGACGGCGCGCATGGCGA R – AAGTCTACGCGGTGAGGT	49
PK31	F – GATGGCTCCCGTAAAGATCA R – TTTCCATTTTCGAAAGCAC	50
PK32	F – GCGAGGCTCAACCAAGAG R – GCAAGGCTGGCTGAATCTAC	52
PK34	F – CGCAAATCGCAACCTTATTT R – CCTTGGAGATCCACAGATCC	50
PK57	F – AATTGGAAGGTTGGTGACG R – GTAACCTACCTGGGGAAAA	50

Two species: *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii* were collected from 3 provinces of Kazakhstan – Almaty, Zhambyl, South-Kazakhstan, *Ae. triuncialis*, *Ae. crassa* were mainly collected from South-Kazakhstan province at various altitudes: *Ae. cylindrica* – 198–2200 m above sea level, *Ae. tauschii* and *Ae. triuncialis* – 223–934 m, *Ae. crassa* – 214–710 m. All plant accessions were maintained by the Department of Field Crop Genefund, Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture and Plant Growing. The specimens representing each accession were grown in the experimental field (the foothill zone of the Zailiysky Alatau – 48°N, 77°E, 740 m above sea level) with the number of days with temperatures below 0 °C ranged from 125 to 130 and the average perennial precipitation of 360–400 mm. The soil cover of the experimental plot was light chestnut soils.

For phenotyping the protocols and technical guidelines of management in the field were used (Prescott et al., 2002; Engels, Visser, 2003; Reed et al., 2004). Such parameters as height of plants, spike length, number of spikelets, number of kernels and spike density were determined on randomly selected spikes from healthy mature plant specimens of each accession. The height of plants was measured from the ground to the top of the terminal spikelets on the spike (excluding awns), the spike length – from the base of the lowermost spikelet to the top of a spike excluding awns. The spike density was calculated from the number of spikelets divided by the spike length. Data on heading time were recorded according to the international methodology (from 01.01.), when approximately

50 % of the plants in a plot showed spikes. Winter hardness was calculated as the percentage of plants having survived in the spring after the last date of a possible winter kill report. Evaluation of the collections for leaf rust resistance was carried out using the modified Cobb scale (Peterson et al., 1948), where R marked resistance, MR – moderate resistance, MS – moderate susceptibility, S – susceptibility.

The genomic DNA from five- or seven-day seedlings was isolated according to the protocol of Thermo Scientific (EU) DNA isolation kit. The purity of the preparations was checked by electrophoretic separation in 1 % agarose gel and by spectrophotometry. A genomic DNA bank was put for *ex situ* storage (–70 °C, long-term). For molecular genetic analysis microsatellite markers (SSR) that had previously provided good results in the phylogeny of the genera *Triticum* and *Aegilops* were used (Bandopadhyay et al., 2004). PCR with STS primers was performed in a mixture containing 1 unit of HotTaq polymerase (Sileks), 4 pmol of forward and reverse primers, 200 µM each of dNTP and 100 ng of DNA. The PCR conditions were as follows: 95 °C – 5 min, 94 °C – 1 min, 49–53 °C (depending on the primer sequence, see Table 1) – 1 min, 72 °C – 1 min, repeated for 35 cycles, the last elongation – 5 min at 72 °C. Primers of the given sequence were synthesized in the ASM 800 machine (Biosset, Russia) using the phosphoimide method according to the Manufacturer's Instruction (Manual of oligonucleotides synthesizer ASN800. Novosibirsk, Russia, "Biosset", 2002). Sequences of the primers used in the study are presented in Table 1.

The amplification reaction products were fractionated in 10 % polyacrylamide gel (PAGE). Electrophoresis was performed at the voltage of 10 V/cm in 1×TBE buffer (50 mM Tris-H₃BO₃, 2 mM EDTA, pH 8.0).

Results

Winter hardness is the main adaptive feature of winter crops highly correlating with productivity (Grabovets, Fomenko, 2015; Gorash et al., 2017). Depending on the species and the site of collection, germination in autumn sowing ranged from 32 % (*Ae. tauschii*) to 73 % (*Ae. triuncialis*), the winter hardness varied from 10 to 100 %, see Fig. 2. High winter hardness (up to 100 %) marked 45.5 % of *Ae. triuncialis* accessions and 38.5 % of *Ae. tauschii* accessions. 14 accessions with high level (80–100 %) of winter hardness were selected: 2 accessions of *Ae. cylindrica* (T. Ryskulov, Sairam districts); 5 accessions of *Ae. tauschii* (T. Ryskulov, Saryagash, Arys, Otrar districts, Taldykorgan); 5 accessions of *Ae. triuncialis* (T. Ryskulov, Sairam, Bayzak, Talas, Jualinsky districts); 2 accessions of *Ae. crassa* (Ordabasinsky, Shardara districts).

Boxplots for six agronomical traits of *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa* are shown in Fig. 3 and 4. In each boxplot, the lower and upper boundaries of the box indicate 25 and 75 percentiles, the line within the box indicates the median, the lower and upper whiskers – the minimum and maximum within 1.5 times range of the box, the circles – the data points outside 1.5 times range of the box.

Vegetation period is one of the plants' basic biological properties that determine their suitability for environmental conditions. The vegetation period, in particular, the speed of development up to heading is associated with many properties that determine the reaction of plants to frost and drought, rust,

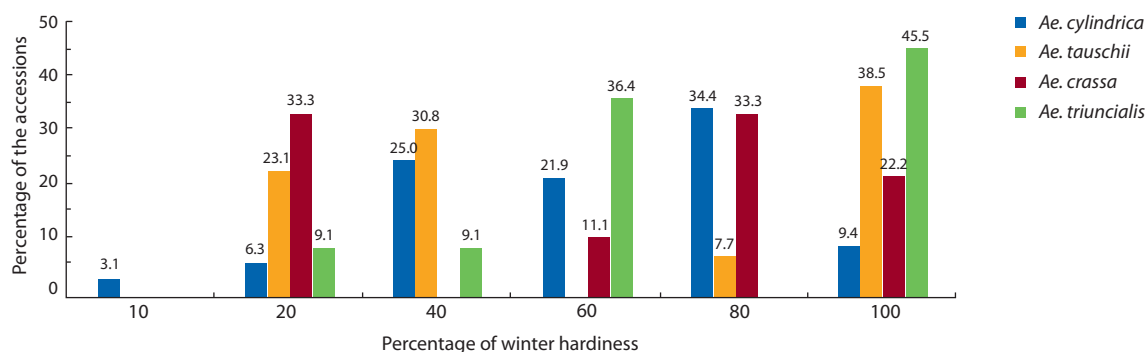


Fig. 2. The range of winter hardiness variability of Kazakhstan *Aegilops* L. species.

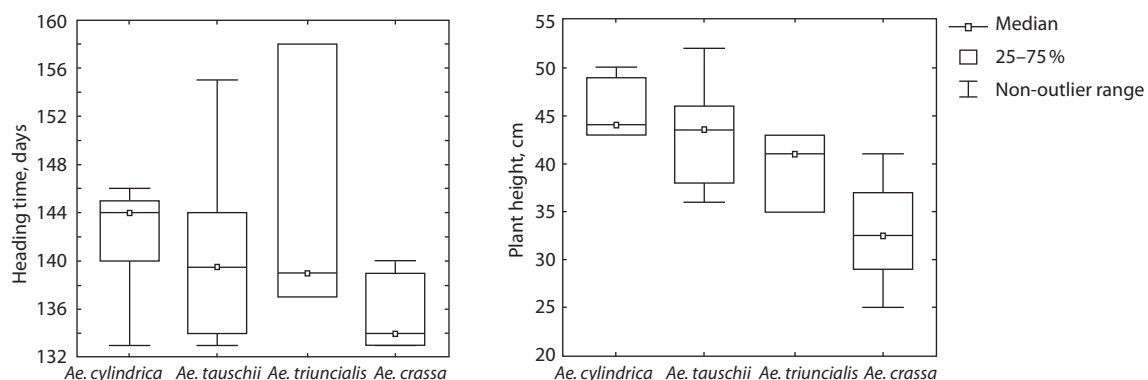


Fig. 3. Boxplots for 2 agronomical traits (heading time and plant height) in *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*.

insect damage, productivity and grain quality (Kamran et al., 2014; Likhenko et al., 2014; Chen et al., 2016).

Depending on the species and the site of collection, significant intra- and inter-specific differences were observed in heading time. The range of variability between the variants is marked as 7 days (133–140) for *Ae. crassa*; 13 days (133–146) for *Ae. cylindrica*; 21 days (137–158) for *Ae. triuncialis*; 22 days (133–155) for *Ae. tauschii* (see Fig. 3). There were selected early headed (133–135 days) 8 accessions from *Ae. cylindrica*, *Ae. crassa* from Zhambyl, South Kazakhstan and *Ae. tauschii* from the Almaty province. Early headed accessions of *Ae. tauschii* from the Sarkand and Taldykorgan districts of the Almaty province were clearly separated from *Ae. tauschii* (155 days) accessions from the Baizak, Merken and T. Ryskulov districts of the Zhambyl province.

The plant height of local populations in most cases was presented by dwarf accessions: *Ae. tauschii* (35–46 cm), *Ae. cylindrica* (43–50 cm), *Ae. crassa* (25–41 cm) and *Ae. triuncialis* (41–52 cm) (see Fig. 3).

The length of the spike varied from short to very long (5–14 cm) (see Fig. 4). According to the length of the spike, all accessions were divided into 2 groups. A short spike (5–7 cm) was registered in *Ae. triuncialis* and *Ae. tauschii*; long (10–12 cm) and very long (≥ 14 cm) length of the spike in three species: *Ae. cylindrica* (Almaty, Zhambyl, South Kazakhstan provinces), *Ae. tauschii* (Almaty province) and *Ae. crassa* (Zhambyl, South Kazakhstan provinces). *Ae. cylindrica* was characterized by high intra-specific variation of spikelet number (5–13 pcs.) and spike density (0.5–1.1) (see Fig. 4).

The average number of spikelets per spike were: *Ae. cylindrica* – 8.8 pcs., *Ae. tauschii* and *Ae. crassa* – 8.2 pcs., *Ae. triuncialis* – 3.3 pcs. A relatively high number of spikelets per spike (13.0 pcs.) with a spike length of 12.0 cm was a characteristic for *Ae. cylindrica* species, collected in the Almaty province (spike density was 1.1). The average number of kernel per spike was generally low with intra-specific variations, depending on the site of collection: from 4 pcs. (*Ae. triuncialis*, Zhambyl province) to 14 pcs. (*Ae. tauschii*, Almaty province) (see Fig. 4). Phenotypic monitoring using an optical sensor “Greenseeker” showed that the accessions had a low NDVI biomass index – from 0.23 to 0.34, which is explained by their low productivity.

Rust fungi of wild cereals, as well as their host plants, are distinguished by a great variety of species. Wild relatives, in particular *Aegilops* L. genus can serve as sources and donors of wheat resistance. The introgression of rust resistance genes from wild species-relatives into commercial varieties is one of the genetic methods for increase of the bread wheat resistance (*Triticum aestivum* L.) (Koishibayev, 2002). Though a large number of resistance genes are available for breeding, the search for novel sources of resistance is of particular importance because of the changing virulence in the population of the pathogen as stressed by R.A. McIntosh and Z.A. Pretorius (2011). Susceptibility (MS – 40 %) to leaf rust was noted for the accessions of *Ae. cylindrica* from 2 districts (T. Ryskulov, Merken) of the Zhambyl province and *Ae. crassa* from the Ordabasy district of South Kazakhstan. Resistance to leaf rust on an artificial background was recorded for the accessions

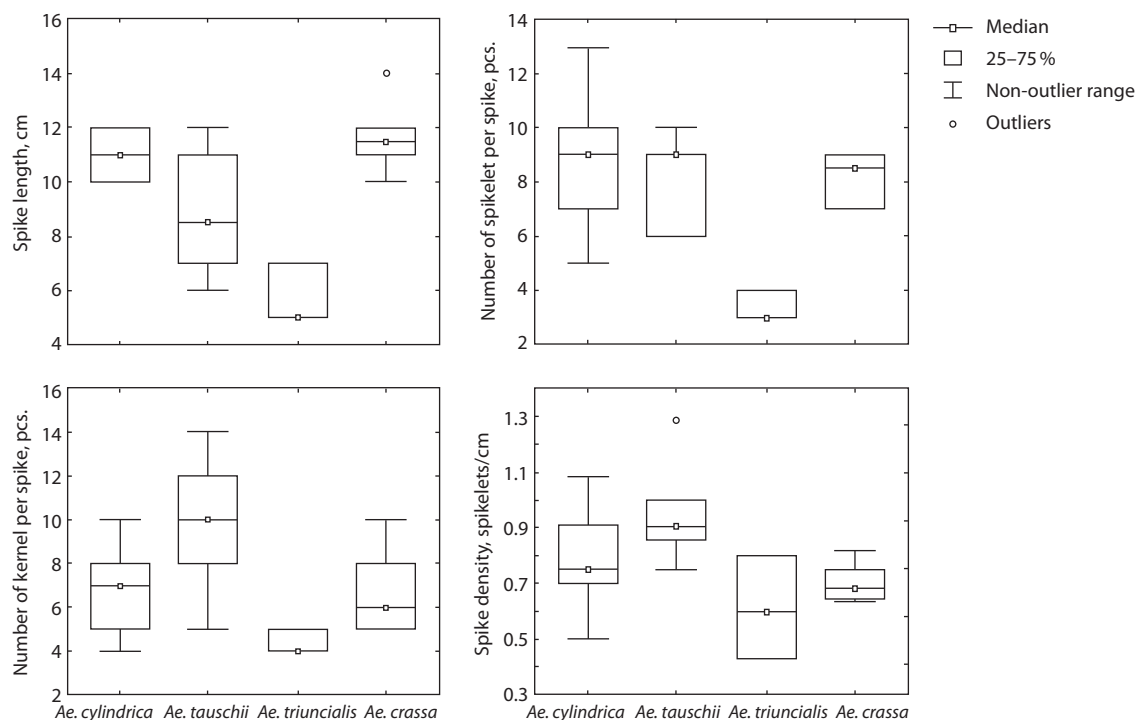


Fig. 4. Boxplots for 4 agronomical traits (spike length, number of spikelets per spike, number of kernel per spike and spike density) in *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa*.

of *Ae. triuncialis*, *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica* (Saryagash and Sayram districts) and *Ae. crassa* (Shardara and Sayram districts) from South Kazakhstan ($R = 0-5\%$).

Development and improvement of the methods of molecular genetic analysis opens up new opportunities for study of the population structure and the principles of spatial distribution of wild plant species. Polymorphism analysis of different sections of genomic DNA enables one to identify intraspecific genetic diversity, to reconstruct phylogenetic relationships between species and spatial relationships between populations, and also assess the well-being of the population and its ability to withstand adverse external influences, including anthropogenic ones. Molecular genetic studies make it possible to assess the level of DNA polymorphism in populations, intra-population genetic diversity, to establish the degree of genetic similarity between species, populations and individuals directly at the genetic level, in some cases to assess the heterozygosity of the population, and to study genetic variability in individual loci and gene alleles. Analysis of 50 accessions of local and foreign ecotypes of *Aegilops* spp. was carried out to assess the use of EST-SSRs microsatellite repeats, characterized by localization only in the coding part of the genome of the studied organisms. As shown by R. Bandopadhyay et al. (2004), these microsatellite markers are highly conserved for *Triticeae* and can be used in study of the genetic diversity of both intraspecific and intergeneric relationships between certain species of the same tribe. From the 64 EST-SSR markers, eleven were selected for our study: PK1, PK3, PK5, PK8, PK9, PK18, PK29, PK31, PK32, PK34, and PK57. The analysis of the informativeness and, thus, the justification of use of a specific marker in the future, was determined by statistical processing of the results for all the studied accessions as a whole. Of the eleven mark-

ers, eight were effective and provided the amplicons of the right size. The results of DNA amplification with markers PK3, PK8 and PK57 were difficult to interpret. For the rest, allelic polymorphic variants, frequency of occurrence for each of them separately, heterozygosity for each marker separately, and the average heterozygosity for the studied group were established. The most informative of all the studied markers were PK1 and PK5. So, for the PK1 marker the presence of five allelic variants was shown, and six were identified for PK5. Four alleles were detected for the PK18, PK31 and PK32 markers. For the remaining PK9 and PK29, PK34 markers, the presence of three and two alleles was demonstrated. High heterozygosity was detected for PK1 and PK18. It was found that 56 % of the accessions were heterozygous for the PK1 marker and 68 % – for PK18. This index for the other markers did not exceed 34 %. The PK29 and PK34 markers in the examined group showed only the presence of homogeneous accessions. In the studied group of plants, the average number of alleles was 2.73 per locus and the average heterozygosity reached 20 %. The frequency of occurrence, calculated for each allele, is presented in Table 2. The presence of three allelic variations in the PK9 marker was established in most accessions of *Ae. triuncialis* and *Ae. crassa* species. These species are characterized by hexaploid DMS genome for *Ae. triuncialis* species and DCDM for *Ae. crassa* (<http://herbarium.usu.edu/triticeae/genomesaegilops.htm>, circulation date 10.09.2016). Perhaps, the gene from which PK9 was developed is present in all three genomes of these species. Thus, it was established that the studied group of wild representatives of *Aegilops* genus was characterized by the presence of more variants of alleles in many of the studied markers, in comparison with the results obtained for *Ae. cylindrica* and

Table 2. Allele frequencies of polymorphic loci for all studied accessions

Marker	Allele	Frequency of occurrence
PK1 $H_o = 0.56$	1	0.3
	2	0.36
	3	0.04
	4	0.25
	5	0.05
PK5 $H_o = 0.18$	1	0.1
	2	0.46
	3	0.07
	4	0.27
	5	0.06
	6	0.04
PK9 $H_o = 0.32$	1	0.1233
	2	0.5533
	3	0.3234
PK18 $H_o = 0.68$	1	0.16
	2	0.47
	3	0.19
	4	0.18
PK29 $H_o = 0$	1	0.489
	2	0.511
PK31 $H_o = 0.16$	1	0.14
	2	0.17
	3	0.61
	4	0.08
PK32 $H_o = 0.34$	1	0.28
	2	0.5
	3	0.15
	4	0.07
PK34 $H_o = 0$	1	0.58
	2	0.32
$H_{ave} = 0.2; H_{ave exp} = 0.428$		

Note: H_o – heterozygosity of the locus, H_{ave} – average heterozygosity, $H_{ave exp}$ – average expected heterozygosity.

Ae. tauschii species. The revealed difference is most likely caused by high heterogeneity in the species, genomic and geographic features of the accessions.

Discussion

Agronomic traits. Wild plants have a capacity to adapt to environmental conditions. Phenotypic analyses revealed a significant variation within and between the populations. Since the heading time is an important adaptive trait in wild species, it remains possible that there is some relationship between geographical distribution and suitability for environmental conditions (Kato et al., 1998; Kooyers, 2015). In the present study, differences in the heading time were observed and it was assumed that these variations had been shaped in response to differences in the habitat environments of each species. Heading time coincide with the general strategy of adaptation to dry

conditions observed frequently in annual plants. Therefore, candidates for the drought tolerance traits can be selected from early heading (133–135 days) of the *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii* and *Ae. crassa* accessions that grow in areas with lower rainfall (South Kazakhstan province). These species could be useful as genetic resource for creating varieties that tolerate to the drought. In contrast, the *Ae. tauschii* accessions from Baizak, Merken, T. Ryskulov districts of the Zhambyl province had a longer heading time (155–158 days). The *Ae. cylindrica* and *Ae. tauschii* accessions from the same geographical region (Zhambyl province) were differed on heading time. The difference in a sympatric area could promote divergence of the species (i. e. act as a lead speciation event (Ohta et al., 2017)). This suggests that difference on heading time for *Ae. cylindrica* and *Ae. tauschii* reflects genetic differences between the two species rather than a phenotypic response to the environment. The heading time in these species will also improve the understanding of similar processes in wheat. The understanding of genetic control of such adaptation will be useful for future attempts to breed high stress-tolerant varieties of agriculturally-important crops, such as wheat (Bandou et al., 2009).

In the present study, clear differences were detected in agronomic traits (see Fig. 2–4). Accessions were distinguished successively by their spike length, number of spikelets per spike, number of kernel per spike, and spike density. The positive correlations indicating the possibility of using these species in wheat breeding was identified. The heading time was positively correlated in *Ae. triuncialis* with: (1) the number of spikelets per spike and the number of kernel per spike ($r = 0.89$); in *Ae. crassa* with: (1) number of kernel per spike ($r = 0.84$); (2) the length of the spike ($r = 0.56$). Plant height of *Ae. tauschii* highly correlated with: (1) the number of spikelets per spike ($r = 0.84$); (2) the number of kernel per spike ($r = 0.73$), and (3) the length of the spike ($r = 0.51$). The length of the spike had a high positive correlation with: (1) the number of spikelets per spike ($r = 0.82$) – *Ae. cylindrica*; ($r = 0.65$) – *Ae. crassa*; ($r = 0.76$) – *Ae. tauschii*; (2) the number of kernel per spike ($r = 0.84$) – *Ae. cylindrica*; ($r = 0.93$) – *Ae. tauschii*; ($r = 0.69$) – *Ae. crassa*.

Thus, by the conducted investigations, it was formation of *ex situ* collection of the *Aegilops* L. genus local populations reflecting the intra- and inter-population diversity. The sources of early ripeness, winter hardiness and resistance to diseases were identified.

Molecular-genetic analysis. The microsatellite analysis was carried out using 11 EST-SSR markers (PK1, PK3, PK5, PK8, PK9, PK18, PK29, PK31, PK32, PK34, and PK57). Of all these markers, eight markers were effective. For each marker, allele frequency and heterozygosity were calculated. The mean number of alleles was determined to be 2.73, and the average heterozygosity was 20 % for the studied group. The most informative of all the studied markers were PK1 and PK5. So, for PK1 marker, the presence of 5 allelic variants was demonstrated, and six were identified for PK5. The remaining markers showed the presence of 4 to 2 alleles. For hexaploid accessions of *Ae. crassa* species with PK9 marker three simultaneous allelic variants were established. The differences may enhance species divergence and could represent a lead speciation event. The results of this study will facilitate identification of populations or accessions of

wild wheat with favorable traits and/or novel adaptive genes. A bank of genomic DNA was created and put for *ex situ* storage (–70 °C, long-term) at the Institute of Molecular Biology and Biochemistry of the MES of the RK. Further studies on these traits in the complex will provide new insight into species differentiation and diversification.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

References

- Alimgazinova B.Sh., Yessimbekova M.A. Plant genetic resources of Kazakhstan: status and prospects. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2013; 3(1):21-25. DOI 10.1134/S2079059713010036.
- Bandopadhyay R., Sharma Sh., Rustgi S., Singh R., Kumar A., Balyan H.S., Gupta P.K. DNA polymorphism among 18 species of *Triticum-Aegilops* complex using wheat EST-SSRs. Plant Sci. 2004; 166:349-356. DOI 10.1016/j.plantsci.2003.09.022.
- Bandou H., Rodriguez-Quijano M., Carrillo J.M., Branlard G., Zahariva M., Monneveux P. Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. Plant Syst. Evol. 2009;277:85-97. DOI 10.1007/s00606-008-0106-z.
- Chen H., Moakhar N.P., Iqbal M., Pozniak C., Hucl P., Spaner D. Genetic variation for flowering time and height reducing genes and important traits in western Canadian spring wheat. Euphytica. 2016; 208:377-390. DOI 10.1007/s10681-015-1615-9.
- Engels J.M.M., Visser L. (Eds.). A Guide to Effective Management of Germplasm Collections. IPGRI Handbooks for Genebanks. No. 6. IPGRI, Rome, Italy, 2003.
- Grabovets A.I., Fomenko M.A. Some aspects of the winter wheat breeding for winter hardiness in the conditions of changing climate. Russ. Agric. Sci. 2015;41(1):1-4. DOI 10.3103/S1068367415010073.
- Gorash A., Armonienė R., Liatukas Ž., Brazauskas G. The relationship among freezing tolerance, vernalization requirement, *Ppd* alleles and winter hardiness in European wheat cultivars. J. Agric. Sci. 2017;155(9):1353-1370. DOI 10.1017/S0021859617000521.
- Holubec V. Triticeae biodiversity and conservation, a “genebanker” view. Czech J. Genet. Plant Breed. 2005;41:118-121.
- Holubec V. Monitoring, collection and conservation of landraces and wild plant genetic resources, in situ, on farm. Czech J. Genet. Plant Breed. 2010a;46:1-110.
- Holubec V. Monitoring of selected threatened species in Bohemia. Czech J. Genet. Plant Breed. 2010b;46:21-26.
- <http://herbarium.usu.edu/triticeae/genomesaegilops.htm>. Accessed 10.09.2016.
- Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. Euphytica. 2014;197: 1-26. DOI 10.1007/s10681-014-1075-7.
- Kato K., Tanizoe C., Beiles A., Nevo E. Geographical variation in heading traits in wild Emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. II. Variation in heading date and adaptation to diverse eco-geographical conditions. Hereditas. 1998;128(1):33-39. DOI 10.1111/j.1601-5223.1998.00033.x.
- Koishibayev M.K. Diseases of Cereal Crops. Almaty, 2002. (in Russian)
- Kooyers N.J. The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. Plant Sci. 2015;234:155-162. DOI 10.1016/j.plantsci.2015.02.012.
- Likhenko I.E., Stasyuk A.I., Shcherban A.B., Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. Analysis of the allelic variation of the *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in Siberian early and medium early varieties of spring wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1):691-703. (in Russian)
- Maxted N., Kell S.P. CWR in crop improvement: to what extent are they used? Crop Wild Relative Newslett. 2009;7:1-7. Available online at <http://www.pgrsecure.org>
- Maxted N., Kell S.P., Ford-Lloyd B.V., Dulloo M.E., Toledo A. Toward the systematic conservation of global crop wild relative diversity. Crop Sci. 2012;52:774-785. DOI 10.2135/cropsci2011.08.0415.
- Maxted N., Magos Brehm J., Kell S. Conservation and Sustainable Use of PGRFA: A Toolkit for National Strategy Development. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, 2013.
- McIntosh R.A., Pretorius Z.A. Borlaug Global Rust Initiative provides momentum for wheat rust research. Euphytica. 2011;179:1-2. DOI <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0389-y>.
- Ohta A., Yamane K., Kawahara T. Relationship between spike morphology and habitat of four *Aegilops* species of section Sitopsis. Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64(5):889-899. DOI 10.1007/s10722-016-0408-x.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. Can. J. Res. Sect. 1948;C26:496-500.
- Prescott J.M., Burnet P.A., Saari E.E., Ransom J.K., Bowman J., de Milliano W., Singh R.P., Bekele G. Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification. Mexico: GTZ-CIMMYT, 2002.
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. Technical Guidelines for the Management of Field and *in vitro* Germplasm Collection. IPGRI Handbooks for Genebanks. No. 7. IPGRI, Rome, Italy, 2004.
- Sitpaeva G.T., Yessimbekova M.A., Morgunov A.I., Karabaev M.K. On the current state of the genetic potential of cereals wild relatives in the southeast and east of Kazakhstan. Proc. of Int. Conf. “Development of Key Areas of Agricultural Sciences in Kazakhstan: Breeding, Biotechnology, Genetic Resources”. Astana, 2004;1:246-252. (in Russian)
- Urazaliev R.A., Alimgazinova B.Sh., Kenenbayev S.B., Yessimbekova M.A. Report on the establishment of the National Information Sharing Mechanism on PGRFA in the Kazakhstan Republic. World Information and Early Warning System on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO (WIEWS), 2007. Available at <http://www.pgrfa.org/gpa/tha/advancedsearch.jspx>
- Yessimbekova M.A., Abugaliev A.I., Mukin K.B. Using of wheat wild relatives (*Aegilops* L.) diversity for balanced use. Proc. of the 4th Int. Conf. “Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology”. Almaty, 2017;1:95.
- Yessimbekova M.A., Sitpaeva G.T., Kozhakhmetov K.K., Morgunov A.I., Karabaev M.K. Agrobiodiversity of agricultural crops in Kazakhstan: wild species and wild relatives. Vestnik Regional'noy Seti po Vnedreniyu Sortov Pshenitsy i Semenovodstvu = Bulletin of the Regional Network on the Introduction of Wheat Varieties and Seed Production. GTZ-CIMMYT, 2004;3(9):38-41. (in Russian)