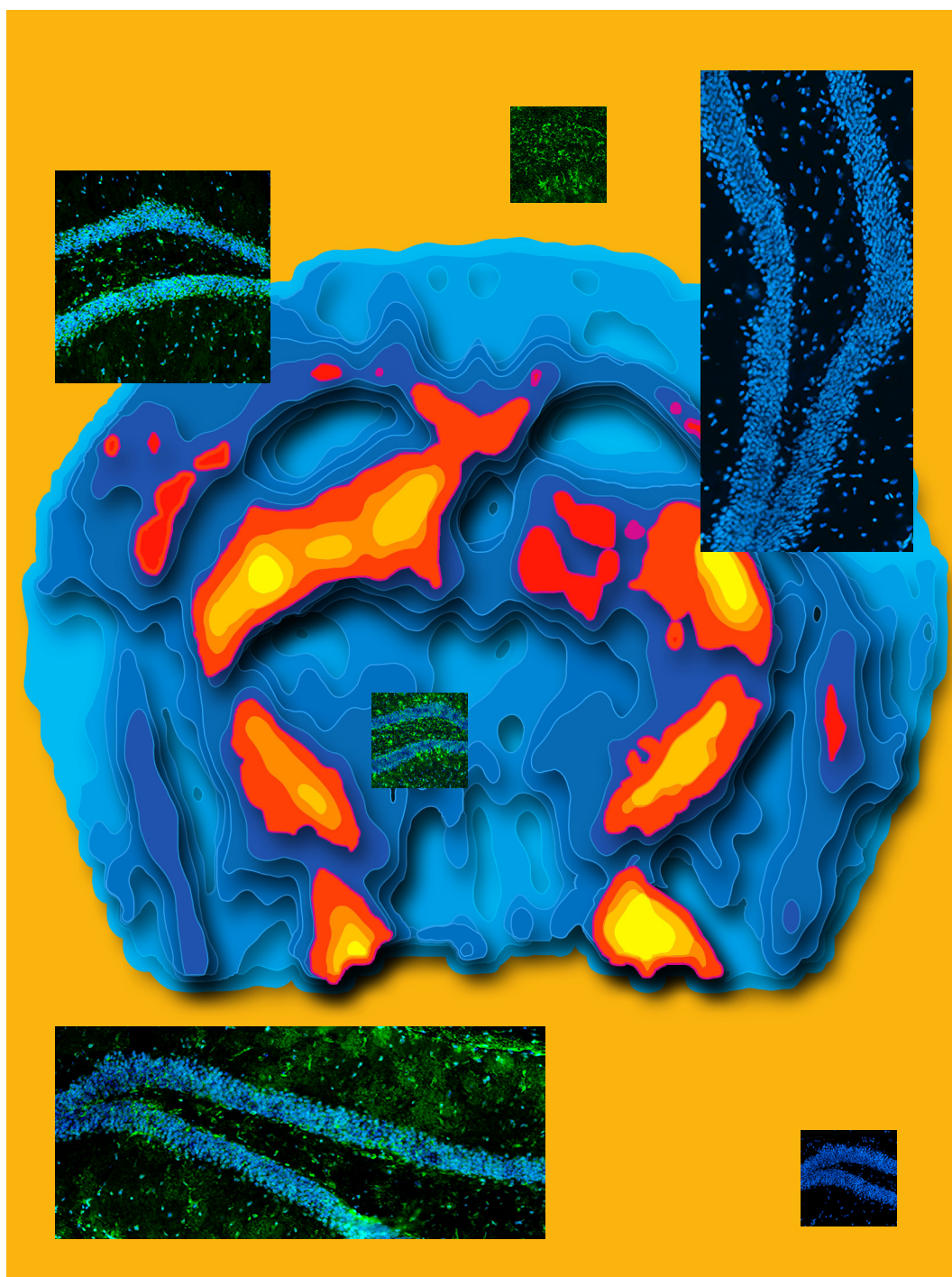


# ВАВИЛОВСКИЙ

## ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2026 • 30 • 6



Генетика и селекция растений / Физиологическая генетика / Генетика животных /  
Медицинская генетика / Палеогенетика / Биоинформатика и системная биология

Сетевое издание

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

## VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

doi 10.18699/vjgb-26-85

### Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

### Главный редактор

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

### Заместители главного редактора

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

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

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

### Ответственный секретарь

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

### Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – д-р биол. наук (Россия)

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

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

Д.А. Афонников – д-р биол. наук, доцент (Россия)

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Б.Р. Кулуев – д-р биол. наук (Россия)

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

С.А. Лашин – д-р биол. наук (Россия)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

И.В. Максимов – д-р биол. наук (Россия)

Б.А. Малярчук – д-р биол. наук (Россия)

Ю.Г. Матушкин – канд. биол. наук (Россия)

С.П. Медведев – канд. биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

Э.К. Хуснутдинова – чл.-кор. РАО, академик АН Республики

Башкортостан, д-р биол. наук (Россия)

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

Е.В. Шахтшнейдер – д-р мед. наук (Россия)

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

С.В. Шеховцов – д-р биол. наук (Россия)

Н.С. Юдин – канд. биол. наук (Россия)

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

Online edition

# VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

## VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

*Founded in 1997**Publication frequency: 8 issues a year*

doi 10.18699/vjgb-26-85

**Founders**

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

**Editor-in-Chief**

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

**Deputy Editor-in-Chief**

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

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

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

**Executive Secretary**

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

**Editorial board**

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

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

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

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

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), United Kingdom

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

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

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

A. Börner, Dr. Sci., Germany

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

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

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

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

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

E.K. Khlestkina, Corr. Member of the RAS, Professor of the RAS,  
Dr. Sci. (Biology), RussiaE.K. Khusnutdinova, Corr. Member of the RAE, Full Member of the AS  
of Bashkortostan, Dr. Sci. (Biology), RussiaA.V. Kilchevsky, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),  
Belarus

B.R. Kuluev, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

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

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I.N. Lebedev, Corr. Member of the RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

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

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

I.V. Maksimov, Dr. Sci. (Biology), Russia

B.A. Malyarchuk, Dr. Sci. (Biology), Russia

Yu.G. Matushkin, Cand. Sci. (Biology), Russia

S.P. Medvedev, Cand. Sci. (Biology), Russia

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

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

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

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

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

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

E.A. Salina, Corr. Member of the RAS, Professor,  
Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Shakhtshneider, Dr. Sci. (Medicine), Russia

S.V. Shekhovtsov, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),  
RussiaV.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),  
RussiaI.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),  
Russia

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

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

N.S. Yudin, Cand. Sci. (Biology), Russia

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

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

## Генетика и селекция растений

- 843 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Холодовая акклиматизация растений томата связана с дифференциальной экспрессией генов семейства *SLH*C, метаболизма каротиноидов и накопления/деградации хлорофиллов. М.А. Филюшин, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева

- 854 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Пребридинговые исследования линий яровой мягкой пшеницы, несущих транслокацию T1BS.1BL-1S#F7L-1BL с геном *Lr51*. С.Н. Сибикеев, А.Е. Дружин, З.Е. Фитилева, И.В. Борисов

## Физиологическая генетика

- 863 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Способность FGF21 снижать выраженность признаков неалкогольной жировой болезни печени у мышей зависит от пола и диеты. Н.Ю. Бальбина, Е.Н. Макарова, Т.В. Яковлева, А.Ю. Казанцева, Н.М. Бажан

- 875 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Влияние отбора по поведению на уровень глюкозы в крови у серебристо-черных лисиц после рестрикционного стресса. Р.Г. Гулевич, С.Г. Шихевич, Д.В. Шепелева, А.В. Харламова

## Генетика животных

- 883 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Полногеномное исследование генетических детерминант преждевременного старения крыс OXYS. В.М. Петрова, М.С. Протасова, А.Д. Манахов, Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова, Е.И. Розаев

- 899 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Эпигенетическая регуляция транскрипционной активности генов, связанных с нейропротекторным действием цефтриаксона, в головном мозге у крыс на модели спорадической болезни Альцгеймера: участие гистоновой деацетилазы 1. А.А. Баширзаде, М.А. Тихонова, В.М. Беличенко, Л.А. Федосеева, М.Д. Беляев, Т.-И. Ренн, Х.-М. Чан, Н.Г. Колосова, Н.Д. Беляев, Т.Г. Амстиславская (на англ. языке)

- 908 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Влияние мутантных генов *APP* и *PSEN1* на асимметрию гиппокампа у мышей 5xFAD – трансгенной модели болезни Альцгеймера. Е.Ю. Брусенцев, И.Н. Рожкова, В.С. Козенева, И.Д. Чекашов, Т.А. Рахманова, О.Б. Шевелев, С.Я. Амстиславский

- 921 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Оценка таксономического и генетического разнообразия лесных мышей рода *Apodemus* степной зоны Центрального Предкавказья. Ф.А. Темботова, А.Х. Амшокова, М.С. Гудова, Е.П. Кононенко

## Медицинская генетика

- 938 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Особенности метилирования ДНК в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела. И.А. Гончарова, А.А. Зарубин, А.В. Марков, С.А. Шипулина, Н.П. Бабушкина, Ю.А. Королёва, А.А. Слепцов, М.С. Назаренко

- 949 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Клинический случай X-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии, вызванной дупликацией Xq13.1, затрагивающей ген *EDA*. В.И. Степаненко, И.Ж. Жалсанова, Е.А. Фонова, А.С. Зуев, С.Н. Государкина, Т.Н. Киреева, Е.Г. Равжаева, А.А. Агафонова, Г.Н. Сеитова, А.С. Монахова, Н.А. Скрыбин

## Палеогенетика

- 955 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Генетический анализ представителя воинской знати из могильника черняховской культуры Дальний (Выдрин) в Курской области. Е.В. Рождественских, Т.В. Андреева, С.С. Кунижева, А.Д. Манахов, М.С. Гашева, О.А. Радюш, И.К. Решетова, М.В. Добровольская, Е.И. Розаев

## Биоинформатика и системная биология

- 964 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Обнаружение болезней земляники садовой с помощью БПЛА на основе сегментации мультиспектральных изображений методами глубокого машинного обучения. А.Ф. Чешкова, В.С. Риксен, О.В. Елкин

- 973 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Визуальный анализ генотипов щавеля (*Rumex* spp.) биplot-методом с использованием морфологических признаков. Н. Сабазня, М. Мохебодин, М. Джанмохаммади, М. Эрфани, К. Фарманпур-Калала (на англ. языке)



## Plant genetics and breeding

- 843 **ORIGINAL ARTICLE**  
Cold acclimation of tomato plants is associated with differential expression of genes of the *SLHC* family, carotenoid metabolism, and chlorophyll accumulation/degradation. M.A. Filyushin, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva
- 854 **ORIGINAL ARTICLE**  
Prebreeding studies of spring bread wheat lines, carrying T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation with *Lr51* gene. S.N. Sibikeev, A.E. Druzhin, Z.E. Fitileva, I.V. Borisov

## Physiological genetics

- 863 **ORIGINAL ARTICLE**  
The ability of FGF21 to ameliorate signs of non-alcoholic fatty liver disease in mice depends on sex and diet. N.Yu. Balybina, E.N. Makarova, T.V. Jakovleva, A.Yu. Kazantseva, N.M. Bazhan
- 875 **ORIGINAL ARTICLE**  
Effect of selection for behavior on the blood glucose level in foxes exposed to restriction stress. R.G. Gulevich, S.G. Shikhevich, D.V. Shepeleva, A.V. Kharlamova

## Animal genetics

- 883 **ORIGINAL ARTICLE**  
Whole genome sequencing identifies genetic variants associated with senescence-accelerated phenotype of OXYS rats. V.M. Petrova, M.S. Protasova, A.D. Manakhov, N.A. Stefanova, N.G. Kolosova, E.I. Rogaev
- 899 **ORIGINAL ARTICLE**  
Epigenetic regulation of the transcriptional activity of genes mediating the neuroprotective activity of ceftriaxone in the brain in a rat model of sporadic Alzheimer disease: the involvement of histone deacetylase 1. A.A. Bashirzade, M.A. Tikhonova, V.M. Belichenko, L.A. Fedoseeva, M.D. Belyaev, T.-Y. Renn, H.-M. Chang, N.G. Kolosova, N.D. Belyaev, T.G. Amstislavskaya
- 908 **ORIGINAL ARTICLE**  
The influence of mutant genes *APP* and *PSEN1* on hippocampal asymmetry in 5xFAD mice, transgenic model of Alzheimer disease. E.Yu. Brusentsev, I.N. Rozhkova, V.S. Kozeneva, I.D. Chekashov, T.A. Rakhmanova, O.B. Shevelev, S.Ya. Amstislavsky

- 921 **ORIGINAL ARTICLE**  
Assessment of taxonomic and genetic diversity of wood mice of the genus *Apodemus* in the steppe zone of the Central Ciscaucasia. F.A. Tembotova, A.Kh. Amshokova, M.S. Gudova, E.P. Kononenko

## Medical genetics

- 938 **ORIGINAL ARTICLE**  
DNA methylation analysis of aortic wall tissue in ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection. I.A. Goncharova, A.A. Zarubin, A.V. Markov, S.A. Shipulina, N.P. Babushkina, Iu.A. Koroleva, A.A. Sleptcov, M.S. Nazarenko
- 949 **ORIGINAL ARTICLE**  
A clinical case of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by an Xq13.1 duplication affecting the *EDA* gene. V.I. Stepanenko, I.Zh. Zhalsanova, E.A. Fonova, A.S. Zuev, S.N. Gosudarkina, T.N. Kireeva, E.G. Ravzhaeva, A.A. Agafonova, G.N. Seitova, A.S. Monakhova, N.A. Skryabin

## Paleogenetics

- 955 **ORIGINAL ARTICLE**  
Genetic analysis of a representative of the military nobility from the Dal'niy (Vydrin) burial ground of the Chernyakhov culture in the Kursk region. E.V. Rozhdestvenskikh, T.V. Andreeva, S.S. Kunizheva, A.D. Manakhov, M.S. Gasheva, O.A. Radyush, I.K. Reshetova, M.V. Dobrovolskaya, E.I. Rogaev

## Bioinformatics and systems biology

- 964 **ORIGINAL ARTICLE**  
UAV-based disease detection in strawberry by multispectral image segmentation invoking deep learning. A.F. Cheshkova, V.S. Riksen, O.V. Elkin
- 973 **ORIGINAL ARTICLE**  
Visual analysis of sorrel (*Rumex* spp.) genotypes by the biplot method using morphological characters. N. Sabaghnia, M. Mohebodini, M. Janmohammadi, M. Erfani, K. Farmanpour-Kalalagh

doi 10.18699/vjgb-26-86

# Холодовая акклиматизация растений томата связана с дифференциальной экспрессией генов семейства *SILHC*, метаболизма каротиноидов и накопления/деградации хлорофиллов

М.А. Филюшин , А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева 

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

 michel7753@mail.ru

**Аннотация.** Растения томата (*Solanum lycopersicum* L.) чувствительны к воздействию холодового стресса, адаптационный ответ на который связан с клеточной осморегуляцией и снижением скорости фотосинтеза за счет нарушения работы антенн фотосистем I и II, включающих белки семейства Light-Harvesting Complex (LHC), связывающие хлорофиллы *a/b* и каротиноиды. В настоящей работе впервые проведен транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии генов семейства *SILHC*, генов биосинтеза каротиноидов и абсцизовой кислоты (АБК), а также генов *ORANGE* и *STAY-GREEN*, связанных с синтезом и деградацией хлорофиллов, в динамике двух циклов (I и II) «холодовой стресс (12 ч) – восстановление (60 ч)». Для анализа использован сорт томата Отрадный. Показано, что за 12 ч до завершения периода восстановления второго цикла (II-48) в листьях растения значительно уменьшается количество хлорофиллов *a/b* и каротиноидов. Выявлено, что 12 ч холодового воздействия в обоих циклах (I-12, II-12) подавляют экспрессию большинства генов семейства *LHC*. В тех же точках обнаружено значимое повышение уровня транскриптов генов *NSY*, *CCD-like*, *LeNCED1* и *NCED6*, связанных с синтезом АБК. Определены гены, профиль экспрессии которых различается между первичным и повторным циклами холодового воздействия. На основании этих данных составлен список генов-кандидатов в маркеры памяти растений о холодовом стрессе: десять генов семейства *SILHC* (*Cab-1A*, *Cab-1D*, *CAB12*, *CAB5-LOC101257186*, *SEP2*, *OHP2-LOC101259223*, *OHP1* и *LIL3-2-LOC101247899*) и пять генов, ассоциированных с синтезом АБК (*VDE*, *CCD4*, *CCD-like*, *LeNCED1* и *NCED6*). Полученные результаты важны для определения и осмысления участия генов, связанных с фотосинтезом, в ответе на холодовой стресс и определении холодостойкости растений томата, и могут быть использованы в селекции холодостойких сортов.

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum* L.; холодовой стресс; семейство белков LHC; хлорофилл *a/b*-связывающие белки; биосинтез каротиноидов; АБК; экспрессия генов

**Для цитирования:** Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Холодовая акклиматизация растений томата связана с дифференциальной экспрессией генов семейства *SILHC*, метаболизма каротиноидов и накопления/деградации хлорофиллов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):843-853. doi 10.18699/vjgb-26-86

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-16-00043, транскриптомный анализ) и Министерства науки и высшего образования РФ (получение и подготовка растений, биохимический анализ).

## Cold acclimation of tomato plants is associated with differential expression of genes of the *SILHC* family, carotenoid metabolism, and chlorophyll accumulation/degradation

М.А. Filyushin , A.V. Shchennikova , E.Z. Kochieva 

Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

 michel7753@mail.ru

**Abstract.** Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is sensitive to cold stress. The plant's adaptive response to low temperatures is accompanied by cellular osmoregulation and a decrease in the rate of photosynthesis due to disruption of the antennae of photosystems I and II, including proteins of the light-harvesting complex (LHC) family that bind chlorophylls *a/b* and carotenoids. In this study, a transcriptome analysis of differential expression of *SILHC* family genes, carotenoid and abscisic acid (ABA) biosynthesis genes, as well as *ORANGE* and *STAY-GREEN* genes associated with chlorophyll accumulation and degradation, was performed for the first time during two cycles (I and II) of "cold stress (12 h) – recovery (60 h)". The tomato cultivar Otradnyi was used for the analysis. 12 h before the end of the recovery period of the second cycle (II-48), the content of chlorophylls *a/b* and carotenoids in plant leaves was shown to be significantly decreased. It was revealed that 12 h of cold exposure in both cycles (I-12, II-12) suppressed the expression

of most *LHC* family genes. At the same time points, a significant increase in the transcript levels of the *NSY*, *CCD-like*, *LeNCED1* and *NCED6* genes associated with ABA synthesis was detected. Genes, expression profile of which differed between the primary and repeated cycles of cold exposure, were identified. Based on these data, a list of candidate genes for cold stress memory markers in plants was compiled: 10 *SILHC* family genes (*Cab-1A*, *Cab-1D*, *CAB12*, *CAB5-LOC101257186*, *SEP2*, *OHP2-LOC101259223*, *OHP1* and *LIL3-2-LOC101247899*) and five genes associated with ABA synthesis (*VDE*, *CCD4*, *CCD-like*, *LeNCED1* and *NCED6*). The obtained results are important for identifying and understanding the involvement of photosynthesis-related genes in the response to cold stress and determining cold tolerance of tomato plants, and can be used in breeding cold-resistant varieties.

**Key words:** *Solanum lycopersicum* L.; cold stress; LHC protein family; chlorophyll *a/b*-binding proteins; carotenoid biosynthesis; ABA; gene expression

**For citation:** Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Cold acclimation of tomato plants is associated with differential expression of genes of the *SILHC* family, carotenoid metabolism, and chlorophyll accumulation/degradation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):843-853. doi 10.18699/vjgb-26-86

## Введение

Развитие растений зависит от окружающих факторов, экстремальные значения которых ограничивают выживание, продуктивность и географическое распространение растений. К числу таких факторов относится холодное воздействие, которое может принимать менее (охлаждение) и более (замерзание) неблагоприятные формы (Kidokoro et al., 2022). Не имея возможности избежать стресса, растения вынужденно адаптируются к стрессовым условиям, в том числе к низким температурам (Browse, Xin, 2001), что сопровождается физиологическими и молекулярно-генетическими изменениями (Ding et al., 2024). Первичный стресс может индуцировать эпигенетические модификации для более эффективной адаптации к его повторению, формируя стрессовую память (Villagómez-Aranda et al., 2022). Гены, по-разному экспрессирующиеся при первом и повторном стрессах, а также в восстановительные периоды между стрессовыми событиями, считаются маркерами стрессовой памяти (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021; Aina et al., 2024).

Одна из значимых групп генов ответа на холодовой стресс связана с фотосинтезом, снижение скорости которого стимулирует клеточную осморегуляцию (Yamori et al., 2014). Последнее достигается закрытием устьиц под действием абсцизовой кислоты (АБК) (Sreenivasulu et al., 2012; Agurla et al., 2018), синтезируемой путем окислительного расщепления каротиноида 9'-*цис*-неоксантина (Nakashima, Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Chen et al., 2020; Xu et al., 2023).

Замедление фотосинтеза под действием холодового стресса характеризуется нарушением захвата световой энергии светособирающими комплексами (антеннами) фотосистем I и II и переноса электронов в тилакоидах (Ashraf, Harris, 2013). В состав антенн входят белки семейства Light-Harvesting Complex (LHC), которые встраиваются в тилакоидную мембрану и нековалентно связываются с хлорофиллами *a* и/или *b*, изменяя их оптические свойства (Klimmek et al., 2006). Полученный набор разных форм хлорофиллов обеспечивает перенос энергии поглощенных квантов к реакционным центрам фотосистем (Li et al., 2025). Также белки LHC принимают участие в деградации хлорофиллов, взаимодействуя с белком STAY-GREEN (SGR) и ферментами катаболизма хлорофилла (CCE) (Pietrzykowska et al., 2014). В семейство LHC входят: хло-

рофилл *a/b*-связывающие белки (chlorophyll *a/b*-binding proteins, CAB или Lhca/b); белок psbS фотосистемы II; белки, подобные светособирающим (Light-Harvesting-like, LIL, включают также светоиндуцируемые белки (Light-Inducible proteins, ELIP), односпиральные белки (One-Helix proteins, OHP), стресс-усиленные белки (Stress-Enhanced proteins, SEP)); феррохелатазы (FC или FeCh) (Jansson, 1999; Klimmek et al., 2006).

Помимо белков LHC и хлорофиллов *a/b*, антенные комплексы включают каротиноиды ( $\beta$ -каротин, ксантофиллы лютеинового и виолаксантинового циклов), которые участвуют в захвате квантов света в спектральных диапазонах, слабо поглощаемых хлорофиллами, с последующей передачей энергии возбуждения на молекулы хлорофиллов (Li et al., 2025). Кроме того, каротиноиды (преимущественно виолаксантин, антероксантин и зеаксантин) защищают фотосинтетический аппарат от излишков энергии возбуждения и предотвращают его разрушение с помощью нейтрализации синглетного кислорода и триплетного хлорофилла (Li et al., 2025).

Важная роль в регуляции содержания хлорофиллов и каротиноидов в зеленых тканях растения принадлежит белку ORANGE (OR). К примеру, уровень экспрессии генов *SIOR* и *SIOR-like* в стеблях и листьях томата *Solanum lycopersicum* L. положительно связывают с количеством хлорофиллов и каротиноидов в клетках листьев (Gao et al., 2025). Однако сверхэкспрессия гена *OR* у модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. подавляет биосинтез хлорофиллов и развитие тилакоидных мембран (Тее, 2019).

Семейство генов *LHC* идентифицировано у разных видов растений, включая *A. thaliana* (30, 32 или 34 гена), тополь *Populus* spp. (36 или 39), хлопчатник *Gossypium hirsutum* L. (86), яблоню *Malus*  $\times$  *domestica* Borkh. (27 или 42) (Klimmek et al., 2006; Zhao et al., 2020; Zhang et al., 2021; Lan et al., 2022).

Растения важной овощной культуры – томата *S. lycopersicum* – очень чувствительны к температурам ниже 12 °C (Mesa et al., 2022), и в Российской Федерации на большей территории выращиваются преимущественно в закрытом грунте из-за риска резких перепадов температур, весенних возвратных холодов или заморозков. В ходе формирования стрессоустойчивости существенным изменениям подвергаются различные фотосинтетические параметры, в том числе экспрессия фотосинтетических

белков (Neilson et al., 2011; Soualiou et al., 2023), поэтому изучение генов *LHC* томата имеет перспективу для использования получаемых данных в селекции новых сортов.

Число генов *S. lycopersicum* семейства *LHC*, как и в случае других видов растений, точно не определено и зависит от конкретного исследования – 40 (Lan et al., 2022) или 39 (Meng et al., 2025). Большинство *LHC* генов содержат в промоторах стресс-ассоциированные *цис*-регуляторные элементы; данные гены дифференциально экспрессируются в ответ на засуху, холодовой и солевой стрессы и могут играть важную роль во многих биологических процессах. Показано, что они регулируются циркадными ритмами (Piechulla et al., 1998; Lan et al., 2022; Meng et al., 2025). Уровень транскриптов генов *SILHC* повышается при адаптации растений к солевому стрессу (Ikuyinminu et al., 2023) и положительно связан со скоростью фотосинтеза (Yan et al., 2023).

Целью настоящей работы стал транскриптомный анализ изменения экспрессии генов *LHC*, генов пути биосинтеза каротиноидов, а также генов, связанных с синтезом в хлоропластах каротиноидов и хлорофиллов, образованием АБК и деградацией хлорофиллов, в листьях растений томата холодостойкого сорта Отрадный в ответ на два цикла «холодовой стресс – послестрессовое восстановление». Полученные результаты важны для определения и осмысления участия генов, связанных с фотосинтезом, в ответе на холодовой стресс и определении холодостойкости растений томата, с возможной идентификацией среди этих генов маркеров памяти о холодовом стрессе.

## Материалы и методы

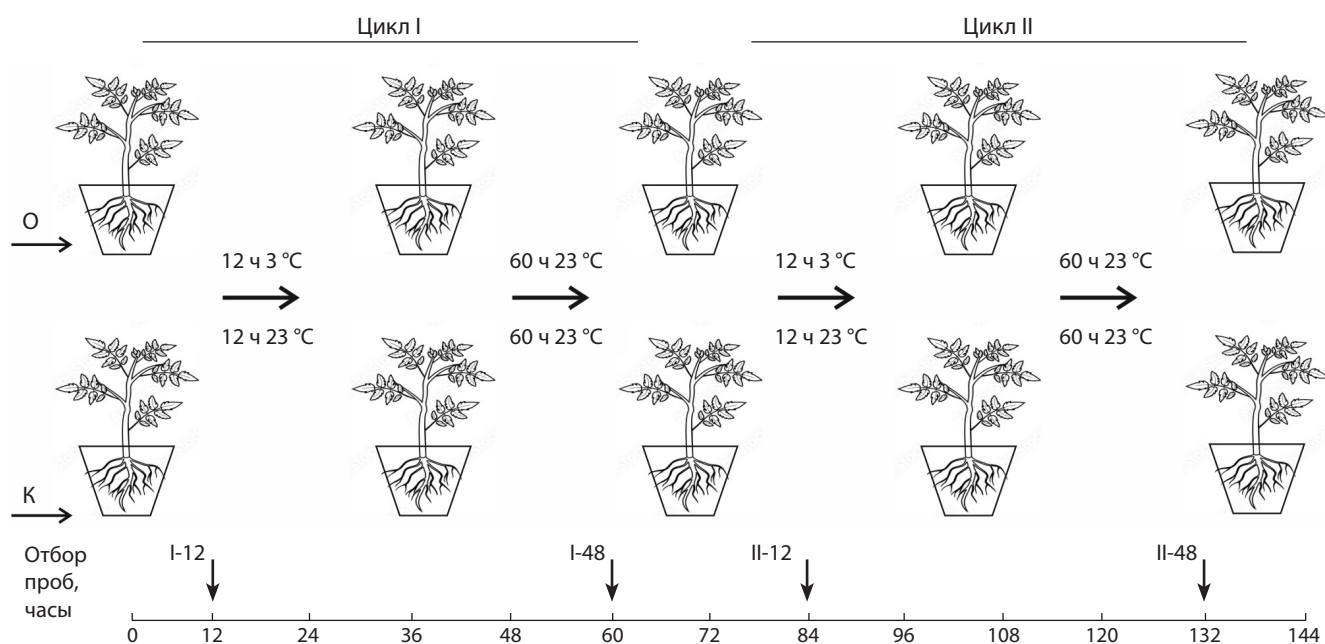
Для исследования использовали растения томата *S. lycopersicum* холодостойкого сорта Отрадный (код 8006741, <https://gossortrf.ru/registry/>) селекции Федерального науч-

ного центра овощеводства (ФНЦО, Московская область). Сорт раннеспелый и устойчивый к солевому стрессу (Филюшин и др., 2025; данные оригинаторов).

Из семян томата сорта Отрадный урожая 2024 г. были получены проростки в стадии 5–7-го листа (день/ночь – 16 ч/8 ч, 23 °C/18 °C; темновая фаза 23:00–7:00; поток ФАР 190 мкМ/(м<sup>2</sup>·с)). Проростки были подвергнуты двум циклам воздействия холодового стресса (контрольные проростки росли в нормальных условиях, 23 °C). Каждый цикл включал 12 ч инкубации при 3 °C (20:00–8:00) (I-12 и II-12) с последующим послестрессовым восстановительным периодом (фаза памяти) в течение 60 ч в нормальных условиях (рис. 1). Циклы следовали непрерывно друг за другом и вместе заняли 144 ч (12+60+12+60).

Применение двухциклового воздействия было обусловлено тем, что признаком генов-маркеров стрессовой памяти считается разное изменение их экспрессии между первым и повторным циклами стрессового воздействия (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021; Aina et al., 2024). То есть если динамика экспрессии анализируемых нами генов в двухциклового стрессе покажет существенные межцикловые различия, такие гены могут стать кандидатами в маркеры стрессовой памяти. Мы применили длительный период восстановления (60 ч), так как одной из особенностей генов-маркеров стрессовой памяти считается то, что их экспрессия в восстановительный период долгое время (больше суток) не возвращается к норме (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021; Aina et al., 2024).

На протяжении двух циклов эксперимента (в сумме 144 ч) не наблюдалось видимых отличий опытных растений от контрольных. Не зафиксировано каких-либо признаков увядания листьев опытных растений в ответ на холодовой стресс обоих циклов (видимо, в связи с



**Рис. 1.** Схема двухциклового (I, II) эксперимента по воздействию холодового стресса и послестрессового восстановления на растения томата сорта Отрадный.



холодостойкостью сорта Отрадный). Также не отмечено значимых различий в высоте растений и количестве и размере листьев как между контролем и опытом, так и внутри контроля/опыта между двумя циклами.

В конце холодового воздействия (12 ч, 8:00) и через 48 ч восстановления (8:00) первого (I) и второго (II) циклов с опытных и контрольных растений были собраны пробы листьев. В восстановительном периоде (60 ч) была выбрана точка 48 ч (I-48 и II-48), за 12 ч до завершения восстановительного периода после стресса, для того чтобы отбор проб в случае и стресса, и восстановления проходил в одно и то же время суток (8:00). Это связано с тем, что экспрессия целевых генов фотосинтеза находится под влиянием циркадных ритмов (Piechulla et al., 1998; Meng et al., 2025). Такое согласование по времени суток в сочетании с использованием для нормализации контроля, параллельно инкубируемого в нормальных условиях, позволило наиболее корректно интерпретировать получаемые биохимические и транскриптомные данные.

В пробах было определено содержание хлорофиллов *a/b* и каротиноидов (два биологических и три аналитических повтора); один биологический повтор – пул листьев двух независимых растений для каждой точки измерения. Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* (мг/г сырой массы (СМ)) и каротиноидов (сумма) определяли в хлороформ-метанольных (3:1, v/v) экстрактах согласно (Efremov et al., 2020), с регистрацией спектров поглощения на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия). Для вычисления концентраций пигментов (мкг/мл) использовали нижеприведенные формулы:

$$\text{Хлорофилл } a \text{ (Chla)} = 11.47 \times (A_{666} - A_{750}) - 2 \times (A_{648} - A_{750}),$$

$$\text{Хлорофилл } b \text{ (Chlb)} = 21.85 \times (A_{648} - A_{750}) - 4.53 \times (A_{666} - A_{750}),$$

$$\text{Сумма каротиноидов} = [1000 \times (A_{480} - A_{750}) - 1.33 \times \text{Chla} - 23.93 \times \text{Chlb}] / 202,$$

где  $A_{666}$ ,  $A_{648}$ ,  $A_{750}$  и  $A_{480}$  – значения поглощения на указанных длинах волн.

Значимость ( $p < 0.05$ ) различий между значениями определяли с помощью Two-way ANOVA (“multiple comparisons, corrected with Bonferroni test”) в GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Из тех же проб листьев для транскриптомного анализа были выделены препараты суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, США), на основе которых получены библиотеки мРНК (NEBNext® mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina; New England BioLabs, США) с последующим их секвенированием на платформе Illumina HiSeq2500 (Illumina Inc., США). Кодирующие последовательности собирали на основе полученных прочтений с использованием Trinity v3.5.13 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>) и TransDecoder v5.1.0 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>) и затем аннотировали с помощью NCBI-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Относительные уровни транскриптов оценивали как RPKM (количество прочтений на 1 кб транскриптов на миллион картированных прочтений).

Гены, дифференциально экспрессирующиеся (ДЭГ) в контроле и опыте в двух циклах в конце стресса (I-12, II-12) и периода восстановления (I-48, II-48), определяли с использованием метода DESeq2 (Love et al., 2014). Различия в уровне транскриптов считались достоверными, если изменение экспрессии было  $\geq 2$  (абсолютное значение  $\log_2\text{FoldChange [FC]} \geq 1$ ;  $p_{\text{adj}}$  (P-value adjusted, или false discovery rate)  $< 0.05$ ). Далее по аннотации проводили поиск генов суперсемейства *LHC* томата, генов пути метаболизма каротиноидов, а также генов *OR*, *OR-like* и *SGR* как среди первичного списка генов, так и среди списка ДЭГ. Изменения профилей экспрессии генов в процессе эксперимента визуализировали с помощью тепловых карт (Excel).

## Результаты

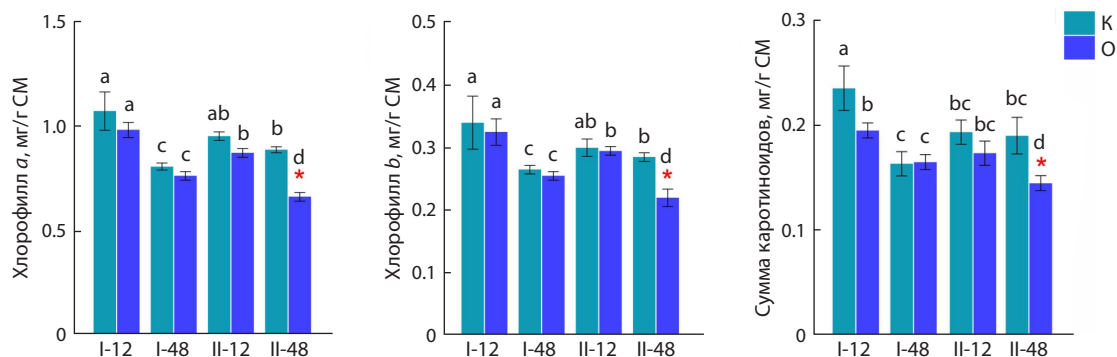
В данной работе на примере холодостойкого сорта томата Отрадный было изучено влияние двух циклов (I, II) «холодовой стресс – восстановление» на содержание метаболитов и экспрессию генов, связанных с фотосинтезом, в листьях. В двух точках каждого цикла с опытных растений были отобраны пробы листьев (параллельно с контролем): конец 12-часового стресса (I-12, II-12); за 12 ч до завершения 60-часового восстановления (I-48, II-48).

В пробах листьев было измерено содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов (сумма). В точке I-48 и в контроле, и в опыте полученные значения оказались значительно ниже, чем в трех остальных точках (II-48, I-12 и II-12). Некоторое исключение составили каротиноиды, содержание которых в точке I-48 отличалось от I-12, но не от II-12, однако было сходно между контролем и опытом (рис. 2). В конце восстановительного периода второго цикла (II-48) в опыте наблюдалось значимое снижение количества всех анализируемых пигментов (см. рис. 2).

Те же листовые пробы были использованы для получения транскриптомов с последующим анализом динамики экспрессии генов, связанных с фотосинтезом. Для этого был составлен список генов интереса с учетом аннотации транскриптомов, данных SolGenomics, включая исследования (Lan et al., 2022; Meng et al., 2025), и NCBI (см. таблицу). В первом исследовании у томата выявлено 24 гена *Lhca/b*, 10 генов *Lil*, один *Psbs* и пять *FCII* (Lan et al., 2022). Во второй публикации говорится о 29 генах *Lhca/b*, семи *Lil*, одном *Psbs* и двух *FCII* (Meng et al., 2025). В дальнейшем мы опирались на данные NCBI, где текущая версия генома томата датируется 03.09.2024, в отличие от SolGenomics (09.2019).

По данным NCBI, семейство *LHC* томата включает 43 гена (29 – *Lhca/b*, 10 – *Lil*, 1 – *psbS*, 3 – *FCII*) (см. таблицу). Также из генома томата извлечены идентификационные сведения о 18 генах пути биосинтеза каротиноидов, 8 генах деоксигеназ, катализирующих переработку каротиноидов в фитогормоны стриголактоны (СГЛ) и АБК, 2 гомологичных генах *OR* (синтез хлорофиллов и каротиноидов в хлоропластах) и 3 гомологичных генах *SGR* (деградация хлорофиллов) (см. таблицу).

Полученные транскриптомные данные были использованы для оценки изменения экспрессии выбранных нами



**Рис. 2.** Динамика содержания хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в листьях растений томата сорта Отрадный в ответ на холодовой стресс и восстановление.

В каждом из двух циклов воздействия (I, II) измерения проведены в конце стрессового воздействия (I-12, II-12) и через 48 ч восстановительного периода (I-48, II-48). Значение <sup>a-d</sup>  $p < 0.05$  – для статистически значимых различий между опытом (О) и контролем (К) в каждой из точек; красной звездочкой дополнительно указано существенное различие между опытом и контролем в точке II-48.

генов (см. таблицу) в листьях томата в процессе двух циклов воздействия холодового стресса (рис. 3 и 4).

В обоих циклах стресса после 12 ч холодового воздействия (I-12, II-12) статистически значимо снизилась ( $\geq 2$  раз) экспрессия генов *Lhca/b*. Исключение составили гены *CAB7-LOC101246628* (I-12, II-12) и *CAB5-LOC101257186* (II-12), уровень транскриптов которых тоже снижался в обеих точках, однако не так значительно ( $< 2$  раз). К завершению восстановительного периода обоих циклов (I-48, II-48) экспрессия генов *Lhca/b* вернулась к контрольным значениям, за исключением повышенного уровня транскриптов *Cab-1D*, *CAB12* и *CAB5-LOC101257186* (I-48) (см. рис. 3).

В случае остальных групп генов семейства *LHC* было показано значительное увеличение экспрессии обоих генов *ELIP* и одной из феррохелатаз (*LOC101263738*) к концу стресса (I-12, II-12). При восстановлении повышенное значение сохраняется (I-48) или возвращается к контролю (II-48). Экспрессия двух генов *LIL3* (*LOC101260362*, *LOC101248227*) и генов *psbS* и *OHPI*, напротив, снижается в ответ на стресс (I-12, II-12) и при восстановлении возвращается к контролю (I-48, II-48; кроме индукции *OHPI* в I-48). Оставшиеся гены не показали значимых изменений экспрессии на протяжении двух циклов стресса-восстановления, за исключением *SEP2* (активация, II-12) и одного из *LIL3-2-LOC101247899* (активация, II-48) (см. рис. 3).

Ранее были сформулированы признаки маркера стрессовой памяти, а именно: маркерами памяти считаются гены, экспрессия которых по-разному изменяется в ответ на первое и повторное стрессовые воздействия, сопровождаемые восстановительным периодом (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021). Исходя из этого к таким маркерам можно отнести гены *Cab-1A*, *Cab-1D*, *CAB12*, *CAB5-LOC101257186*, *ELIP*, *SEP2*, *OHPI-2-LOC101259223*, *OHPI* и *LIL3-2-LOC101247899*, динамика экспрессии каждого из которых имела межцикловые различия (см. рис. 3).

Помимо генов семейства *LHC*, был проведен транскриптомный анализ генов биосинтеза каротиноидов. Анализ

динамики экспрессии генов биосинтеза каротиноидов показал отсутствие значимой реакции на оба цикла «холод – восстановление» генов всех трех фитоинсинтаз (*PSY1–3*), одного из двух *PDS-LOC544073*, *CRTISO*, *Z-ISO*, *ZDS* и *LCY1* (см. рис. 4). Второй *PDS-LOC101244544*, *CrtL-e-1*, *LcyB*, *D27*, *CrtR-b1* и один из двух генов *ZEP* показали одинаковую динамику экспрессии: снижение (I-12, II-12) и возврат к контролю (I-48, II-48). Экспрессия второго гена *ZEP* имела похожую динамику, кроме менее значимого снижения в точке I-12. Уровень транскриптов гена *CrtR-b2*, напротив, снижался после восстановительных периодов (I-48, II-48). Отдельно отметим два гена: неоксантинсинтазы (*NSY*), экспрессия которого значительно повысилась в ответ на холод (I-12, II-12) и вернулась к контролю после восстановительного периода (I-48, II-48), и виолаксантиндеэпоксидазы (*VDE*), уровень транскриптов которого в первом цикле стресса снизился (I-12) и затем поднялся (I-48), а во втором цикле не отличался от контроля (см. рис. 4).

Среди генов, кодирующих ферменты (диоксигеназы) пути преобразования каротиноидов в фитогормоны (СТЛ, АБК), *CCD7* и *LeCCD1A* не показали значимой реакции на два цикла «холод – восстановление». Гены *CCD4* и *NCED6* отличались от контроля только снижением уровня транскриптов в точках II-12 и II-48 соответственно. Экспрессия генов *LeCCD1B* и *NCED2* демонстрировала соответственно значительное уменьшение и повышение после стресса (I-12, II-12). Гены *CCD-like* и *LeNCED1* имели уровень транскриптов существенно выше контрольного, кроме точек I-48 и II-48 соответственно (см. рис. 4).

Из генов, связанных с синтезом и деградацией хлорофиллов, два (*OR-like*, *SGR-like*) не показали отличий от контроля, два (*OR*, *SGR*) имели значимо пониженный уровень транскриптов после стресса (I-12, II-12) и один (*SGR1*) – повышенный уровень в тех же точках (I-12, II-12) (см. рис. 4).

С учетом признаков маркера памяти о стрессе (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021) можно выделить гены *VDE*, *CCD4*, *CCD-like*, *LeNCED1* и *NCED6* (см. рис. 4).

Список анализируемых в работе генов

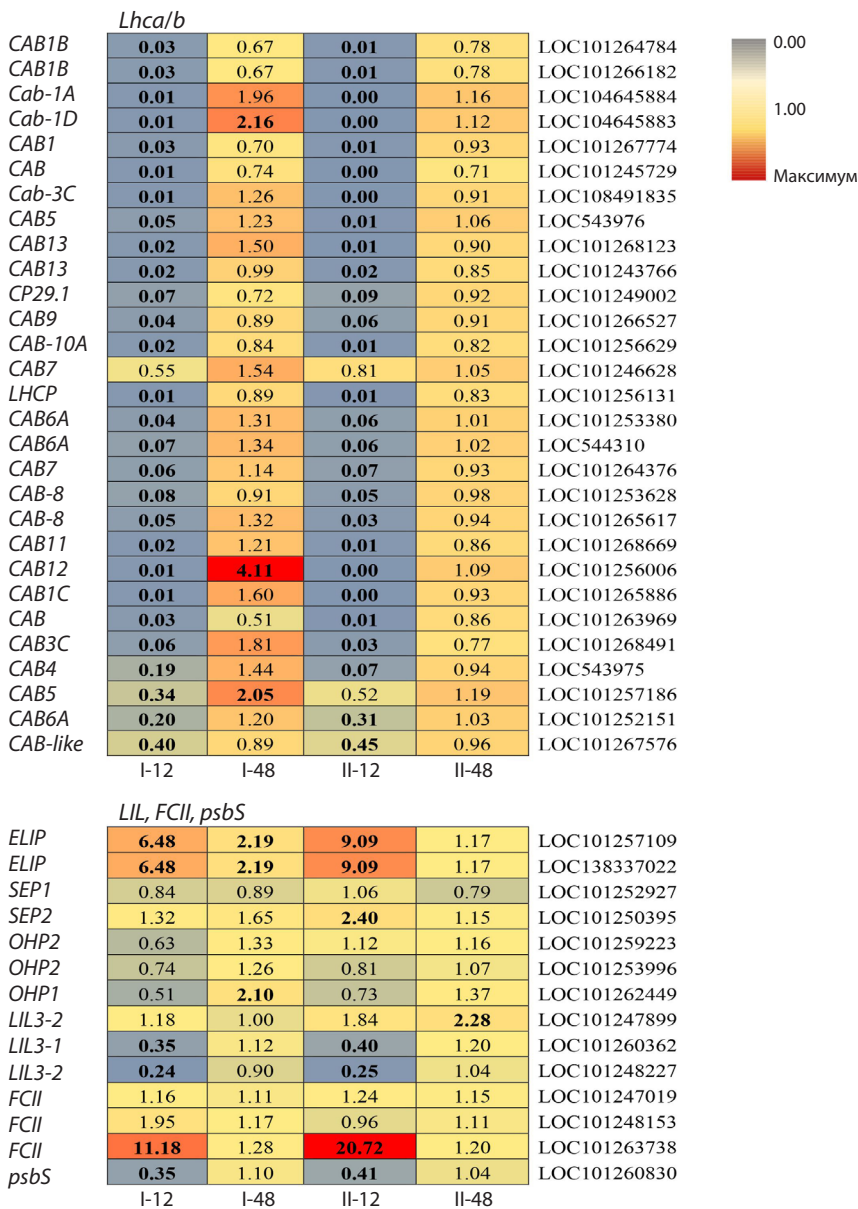
| Суперсемейство <i>LHC</i>  |                           |                                                                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Solyc gene ID <sup>1</sup> | NCBI gene ID <sup>2</sup> | Аннотация белкового продукта гена (NCBI)                                  |
| 02g070940                  | LOC101264784              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> Cab-1B (CAB1B)                    |
| 02g070950                  |                           |                                                                           |
| 02g070970                  |                           |                                                                           |
| 02g071010                  |                           |                                                                           |
| 02g071030                  |                           |                                                                           |
| 02g070990                  | LOC101266182              | CAB1B гомолог, 100 % покрытие, идентичность 99.25 %                       |
| 02g070980                  | LOC104645884              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> Cab-1A (Cab-1A)                   |
| 02g071000                  | LOC104645883              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 1D (Cab-1D)                       |
| 03g005760                  | LOC101267774              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 1-подобный                        |
| 03g005770                  | LOC101245729              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i>                                   |
| 03g005780                  | LOC108491835              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> Cab-3C (Cab-3C)                   |
| 12g006140                  | LOC543976                 | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 5, хлоропластный (CAB5)           |
| 07g063600                  | LOC101268123              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 13, хлоропластный                 |
| 12g011450                  | LOC101243766              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 13, хлоропластный (CAB13)         |
| 09g014520                  | LOC101249002              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> CP29.1, хлоропластный             |
| 06g063370                  | LOC101266527              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> Cab9 (CAB9)                       |
| 01g105030                  | LOC101256629              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> CP24 10A, хлоропластный (CAB-10A) |
| 04g082930                  | LOC101246628              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 7, хлоропластный                  |
| 04g082920                  |                           |                                                                           |
| 01g105050                  | LOC101256131              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> CP24 10B, хлоропластный (LHCP)    |
| 05g056050                  | LOC101253380              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 6A, хлоропластный                 |
| 05g056070                  | LOC544310                 | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> , предшественник (CAB6A)          |
| 10g006230                  | LOC101264376              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 7, хлоропластный (CAB7)           |
| 10g007690                  | LOC101253628              | Тип III. Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> (CAB-8)                  |
| 12g011280                  | LOC101265617              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 8, хлоропластный                  |
| 03g115900                  | LOC101268669              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> CAB11 (CAB11)                     |
| 06g069730                  | LOC101256006              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> Cab12 (CAB12)                     |
| –                          | LOC101265886              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 1C, хлоропластный                 |
| –                          | LOC101263969              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i>                                   |
| –                          | LOC101268491              | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 3C, хлоропластный                 |
| –                          | LOC543975                 | Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> , предшественник (CAB4)           |
| 11g042640                  | LOC101267576              | Не охарактеризован (CAB-like)                                             |
| 07g022900                  | LOC101257186              | Фотосистема I. Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 5, хлоропластный   |
| 12g009200                  | LOC101252151              | Фотосистема I. Белок, связывающий хлорофилл <i>a/b</i> 6, хлоропластный   |
| 09g082690                  | LOC101257109              | Ранний светоиндуцируемый белок (ELIP)                                     |
| 09g082700                  | LOC138337022              | ELIP гомолог, 97 % покрытие, идентичность 84.74 %                         |
| 01g107660                  | LOC101252927              | Стресс-индуцируемый белок 1                                               |
| 04g053130                  | LOC101250395              | Стресс-индуцируемый белок 2, хлоропластный                                |
| 12g056620                  | LOC101259223              | Белок ОНР2, подобный светособирающему комплексу, хлоропластный            |
| 04g071930                  | LOC101253996              | Белок ОНР2, подобный светособирающему комплексу, хлоропластный            |
| 03g094000                  | LOC101247899              | Белок 3 изотип 2, подобный светособирающему комплексу, хлоропластный      |
| 08g007180                  | LOC101260362              | Белок 3 изотип 1, подобный светособирающему комплексу, хлоропластный      |
| 08g077880                  | LOC101248227              | Белок 3 изотип 2, подобный светособирающему комплексу, хлоропластный      |
| 09g011010                  | LOC101262449              | Белок ОНР1, подобный светособирающему комплексу, хлоропластный            |
| 05g018650                  | LOC101247019              | Феррохелатаза-2, хлоропластный белок                                      |
| 10g084140                  | LOC101248153              | Феррохелатаза-2, хлоропластный белок                                      |
| 08g065480                  | LOC101263738              | Феррохелатаза-2, хлоропластный белок                                      |
| 06g060340                  | LOC101260830              | Субъединица S фотосистемы II (psbS)                                       |

Таблица (окончание)

| Метаболизм каротиноидов                                                   |              |                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Аннотация белкового продукта гена (NCBI)                                  | NCBI gene ID | Функциональная активность белкового продукта                                                                                                                                                                                |
| Фитоинсинтаза 1, хлоропластная (Psy1)                                     | LOC543988    | Синтез каротиноидов (ElShamey et al., 2025)                                                                                                                                                                                 |
| Фитоинсинтаза 2, хлоропластная (PSY2)                                     | LOC543964    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Фитоинсинтаза 3                                                           | LOC101267734 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Фитоиндесатураза (pds)                                                    | LOC544073    |                                                                                                                                                                                                                             |
| 15- <i>cis</i> -фитоиндесатураза, хлоропластная /хромопластная            | LOC101244544 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Проликопинизомераза, хлоропластная (CRTISO)                               | LOC101267857 |                                                                                                                                                                                                                             |
| 15- <i>cis</i> -ζ-каротинизомераза (Z-ISO)                                | LOC101253762 |                                                                                                                                                                                                                             |
| ζ-каротиндесатураза (zds)                                                 | LOC543629    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Ликопин-ε-циклаза (CrtL-e-1)                                              | LOC544129    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Ликопин-β-циклаза, хлоропластная                                          | LOC101267662 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Ликопин-β-циклаза (LCY1)                                                  | LOC544104    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Ликопин-β-циклаза, хромопластная (NSY) = неоксантинсинтаза, хлоропластная | LOC543649    |                                                                                                                                                                                                                             |
| В-каротинизомераза D27, хлоропластная                                     | LOC101266539 |                                                                                                                                                                                                                             |
| В-каротингидроксилаза (CrtR-b1)                                           | LOC544133    |                                                                                                                                                                                                                             |
| В-каротингидроксилаза (CrtR-b2)                                           | LOC544297    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Зеаксантинэпоксидаза, хлоропластная                                       | LOC101252420 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Зеаксантинэпоксидаза, хлоропластная (ZEP)                                 | LOC544162    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Виолаксантиндеэпоксидаза (VDE)                                            | LOC543696    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Каротиноид-расщепляющая диоксигеназа 7 (CCD7)                             | LOC100313501 | Синтез СГЛ и АБК (ElShamey et al., 2025)                                                                                                                                                                                    |
| Каротиноид-расщепляющая диоксигеназа 4, хлоропластная                     | LOC101250535 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Каротиноид-расщепляющая диоксигеназа 1A (LeCCD1A)                         | LOC543935    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Каротиноид-расщепляющая диоксигеназа 1B (LeCCD1B)                         | LOC544269    |                                                                                                                                                                                                                             |
| Каротиноид-9,10(9',10')-расщепляющая диоксигеназа                         | LOC101255364 |                                                                                                                                                                                                                             |
| NCED1 9- <i>cis</i> -эпоксикаротиноид-диоксигеназа (LeNCED1)              | LOC544163    |                                                                                                                                                                                                                             |
| NCED2 9- <i>cis</i> -эпоксикаротиноид-диоксигеназа 2                      | LOC100316877 |                                                                                                                                                                                                                             |
| 9- <i>cis</i> -эпоксикаротиноид-диоксигеназа NCED6, хлоропластная         | LOC101246826 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Синтез хлорофиллов и каротиноидов в хлоропластах                          |              |                                                                                                                                                                                                                             |
| Аннотация белкового продукта гена (NCBI)                                  | NCBI gene ID | Функциональная активность белкового продукта                                                                                                                                                                                |
| Белок, подобный ORANGE                                                    | LOC101244466 | Негативно регулируют биосинтез хлорофиллов, развитие тилакоидных мембран и экспрессию генов <i>ELIP</i> у <i>A. thaliana</i> (Tee, 2019). Позитивно влияют на рост и стрессоустойчивость растений томата (Gao et al., 2025) |
| Белок ORANGE-LIKE, хлоропластный                                          | LOC101247247 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Деградация хлорофиллов                                                    |              |                                                                                                                                                                                                                             |
| Аннотация белкового продукта гена (NCBI)                                  | NCBI gene ID | Функциональная активность белкового продукта                                                                                                                                                                                |
| G белок STAY-GREEN                                                        | LOC101260158 | Взаимодействуют с белками LHC и ферментами катаболизма хлорофилла (Pietrzykowska et al., 2014)                                                                                                                              |
| STAY-GREEN гомолог, хлоропластный                                         | LOC101258237 |                                                                                                                                                                                                                             |
| Индуклируемый старением хлоропластов белок stay-green 1 (SGR1)            | LOC778212    |                                                                                                                                                                                                                             |

<sup>1</sup> Current Tomato Genome version SL4.0 and Annotation ITAG4.0 от 09.2019 ([https://www.solgenomics.net/organism/Solanum\\_lycopersicum/genome](https://www.solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome)), с использованием данных исследований (Lan et al., 2022; Meng et al., 2025).  
<sup>2</sup> SLM\_r2.1 (GCF\_036512215.1), сборка и аннотация генома томата от 03.09.2024 (обновления 10.2024–09.2025; [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_036512215.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_036512215.1/)).





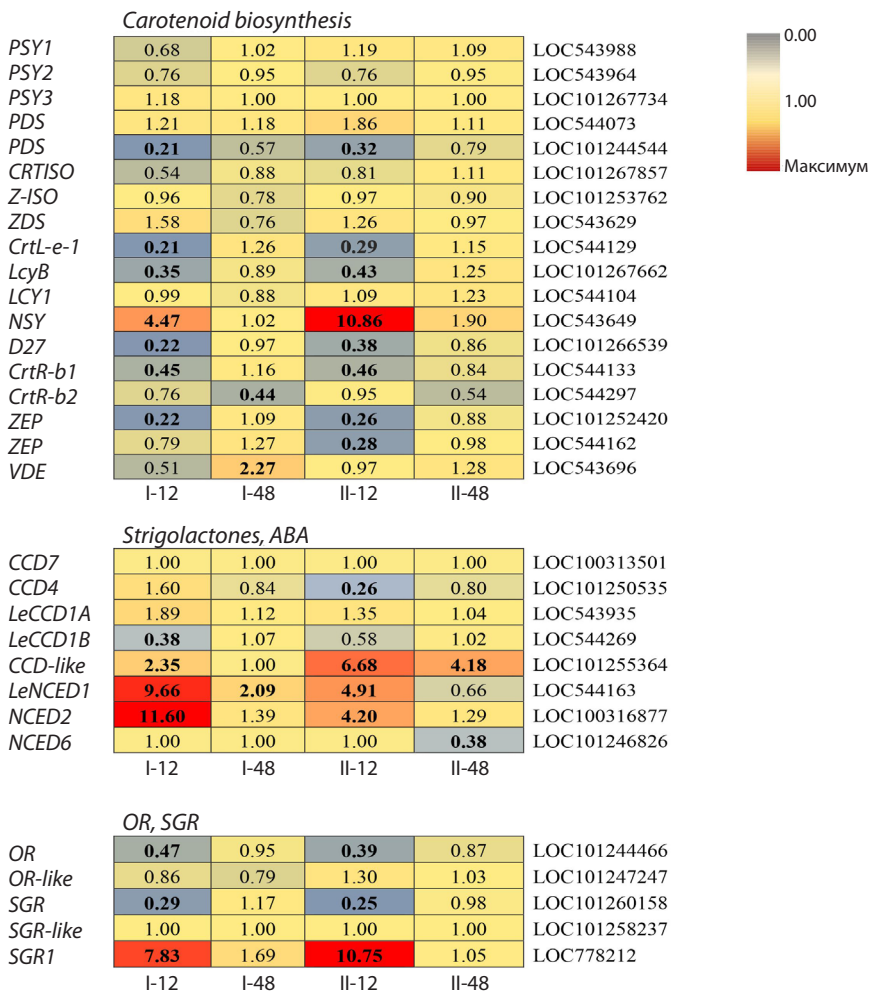
**Рис. 3.** Тепловая карта изменения экспрессии генов суперсемейства *LHC* в листьях растения томата сорта Отрадный (*S. lycopersicum*) в ответ на два цикла (I, II) «холодовое воздействие – восстановление», построенная по полученным нами транскриптомным данным для точек I-12, II-12 (конец стресса) и I-48, II-48 (восстановительный период).

Здесь и на рис. 4: в ячейках приведены значения RPKM, округленные до второго знака после запятой; статистически значимые отличия от контроля (принятого за 1.00) выделены полужирным шрифтом. Градиент окраски ячеек соответствует снижению (оттенки серого) или повышению (оттенки красного) уровня экспрессии генов в сравнении с контролем (1.00, желтая окраска).

Обсуждение

Адаптационная реакция растения на воздействие холода тесно связана с клеточной осморегуляцией, осуществляемой путем закрытия устьиц под действием АБК (Sreenivasulu et al., 2012; Agurla et al., 2018). Предшественником АБК служит 9'-цис-неоксантин, и ее повышенный синтез в ответ на стресс может сопровождаться снижением содержания важных для фотосинтеза ксантофиллов виолаксантинового цикла, что приводит к снижению скорости фотосинтеза (Nakashima, Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Yamori et al., 2014; Chen et al., 2020; Xu et al., 2023). При

этом нарушается работа антенн фотосистем I и II (Ashraf, Harris, 2013), которые включают белки семейства LHC, связывающие хлорофиллы *a/b* и каротиноиды (Klimmek et al., 2006; Li et al., 2025). Изучение генов *LHC*, таким образом, важно для осмысления их роли в ответе на холододовый стресс и определения холодостойкости растений. Поскольку имеющиеся сведения о генах *S. lycopersicum LHC* разнятся (Lan et al., 2022; Meng et al., 2025), первым этапом работы стала идентификация генов этого семейства с использованием упомянутых публикаций и сведений генбанков (SolGenomics и NCBI). Полученные нами ре-



**Рис. 4.** Тепловая карта изменения экспрессии генов биосинтеза каротиноидов, СГЛ и АБК, а также генов *OR* и *SGR* в листьях растения томата сорта Отрадный в ответ на два цикла (I, II) «холодовое воздействие – восстановление». Построено по полученным нами транскриптомным данным для точек I-12, II-12 (конец стресса) и I-48, II-48 (восстановительный период).

зультаты отличаются как по количеству, так и по составу семейства *LHC* (см. таблицу) от исследований (Lan et al., 2022; Meng et al., 2025), задействовавших только базу SolGenomics. Наши данные представляются нам наиболее достоверными, поскольку верифицированы в базе NCBI, где представлена самая последняя на сегодня версия генома *S. lycopersicum* (от 2024 г. vs. 2019 г. в SolGenomics). С учетом участия в фотосинтезе каротиноидов, в список целевых генов были также включены известные гены пути метаболизма каротиноидов (ElShamey et al., 2025) и гены *SGR* и *OR*, связанные с деградацией хлорофиллов (Pietrzykowska et al., 2014) и синтезом хлорофиллов/каротиноидов (Tee, 2019; Gao et al., 2025) соответственно (см. таблицу).

Выбрав для исследования холодостойкий сорт Отрадный, мы провели два последовательных цикла «холод – восстановление» (I, II), каждый из которых включал 12-часовое охлаждение (3 °C) с последующей 60-часовой инкубацией в нормальных условиях (см. рис. 1). Поскольку уровень транскриптов генов *LHC* регулируется

циркадными ритмами (Piechulla et al., 1998; Meng et al., 2025), мы использовали параллельно выращиваемые при нормальной температуре (23 °C) контрольные растения, снимая показания в аналогичных опыту точках.

Измерение содержания хлорофиллов *a/b* и каротиноидов в листьях, собранных в конце 12-часового стресса (I-12, II-12) и в период восстановления (I-48, II-48), показало, что количество всех анализируемых пигментов значительно уменьшилось, но только при завершении второго цикла (II-48) (см. рис. 2). Это позволяет предполагать более эффективный ответ растения на повторный холодовой стресс за счет возможного снижения скорости фотосинтеза и усиления осморегуляции в соответствии с исследованиями (Sreenivasulu et al., 2012; Agurla et al., 2018). То есть в первом цикле в растениях могло произойти запоминание стресса, которое прослеживается в транскриптомных данных.

Из тех же листьев томата были получены транскриптомные, а затем проведен анализ изменения экспрессии целевых генов (см. таблицу): семейства *LHC*, метаболизма

каротиноидов, а также *SGR* и *OR*. Обнаруженное снижение уровня транскриптов большинства генов *LHC* и половины генов биосинтеза каротиноидов в конце стрессового воздействия (I-12, II-12) (см. рис. 3 и 4) предполагает снижение скорости фотосинтеза в листьях томата в ответ на холод, так как скорость фотосинтеза положительно связана с экспрессией генов *LHC* (Yan et al., 2023). С ослаблением фотосинтеза может быть ассоциировано и резкое повышение в тех же точках экспрессии гена *SGR1* (см. рис. 4), участвующего в деградации хлорофиллов (Pietrzykowska et al., 2014), и снижение экспрессии гена *OR* (см. рис. 4), положительно связанного с биогенезом хлорофиллов и развитием тилакоидных мембран (Tee, 2019). В то же время значительное повышение в листьях I-12 и II-12 экспрессии генов *NSY*, *CCD-like*, *LeNCED1* и *NCED6* (см. рис. 4) допускает возможность усиления наработки АБК (ElShamey et al., 2025), связанной с закрытием устьиц в ответ на холодостресс (Sreenivasulu et al., 2012; Agurla et al., 2018).

Ранее было показано, что уровень транскриптов генов *S. lycopersicum LHC* растет в процессе адаптации растений томата к солевому стрессу (Ikuyinminu et al., 2023). Несовпадение с нашими результатами (см. рис. 3) может объясняться как использованием другого стрессового фактора, так и применением авторами исследования биостимулянта PSI-475 перед поливом растений солевым раствором (Ikuyinminu et al., 2023).

В работе (Meng et al., 2025) также приведены значения экспрессии генов *S. lycopersicum LHC* в ответ на однократный 24-часовой холодостресс. В частности, показано, что уровень транскриптов гена *SILhcb1.11* (LOC108491835) понижается, а *SIELIP1* (LOC101257109) повышается, что полностью совпадает с результатами нашего анализа (см. рис. 3). Замалчивание *SILhcb1.11* или *SIELIP1* в растении томата приводит к снижению содержания хлорофиллов, нарушению фотосинтеза и холодостойкости (Meng et al., 2025), что свидетельствует о важной роли этих генов в адаптивном ответе *S. lycopersicum*. По нашим данным, ген *SIELIP1* может быть кандидатом в маркеры стрессовой памяти, так как профиль его экспрессии различается между первым и вторым восстановительными периодами (см. рис. 3). Помимо *SIELIP1*, признакам маркеров памяти о стрессе (Friedrich et al., 2019; Bäurle, Trindade, 2020; Jacques et al., 2021) соответствует еще ряд генов: *Cab-1A*, *Cab-1D*, *CAB12*, *CAB5*-LOC101257186, *SEP2*, *OHP2*-LOC101259223, *OHP1* и *LIL3-2*-LOC101247899, *VDE*, *CCD4*, *CCD-like*, *LeNCED1* и *NCED6* (см. рис. 3 и 4).

## Заключение

В настоящей работе впервые проведен транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии генов *SILHC*, генов метаболизма каротиноидов и генов, связанных с синтезом и деградацией хлорофиллов, в листьях растений холодостойкого генотипа томата в процессе двух последовательных циклов («холод – восстановление») воздействия холодостресса. Получены свидетельства возможного снижения скорости фотосинтеза: уменьшение содержания хлорофиллов и каротиноидов в конце вос-

становления второго цикла (II-48) и снижение уровня транскриптов большинства генов семейства *LHC* в конце каждой стадии охлаждения (I-12, II-12). В точках I-12 и II-12 выявлено также повышение экспрессии генов *NSY*, *CCD-like*, *LeNCED1* и *NCED6*, что может говорить о возможном усилении синтеза АБК в ответ на понижение температуры. На основании полученной динамики экспрессии анализируемых генов выделен список генов-кандидатов в маркеры памяти растений томата о холодострессе: десять генов семейства *SILHC* и пять генов, ассоциированных с синтезом АБК.

## Список литературы / References

- Филиушин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Дифференциальные профили экспрессии генов транскрипционных факторов подсемейства DREB2 в динамике солевого стресса и послестрессового восстановления растений томата. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1213-1220. doi 10.18699/vjgb-25-128
- [Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential expression profile of DREB2 subfamily transcription factor genes in the dynamics of salt stress and post-stress recovery in tomato plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1213-1220. doi 10.18699/vjgb-25-128]
- Agurla S., Gahir S., Munemasa S., Murata Y., Raghavendra A.S. Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. In: Iwaya-Inoue M., Sakurai M., Uemura M. (Eds) *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 1081. Springer, 2018;215-232. doi 10.1007/978-981-13-1244-1\_12
- Aina O., Bakare O.O., Fadaka A.O., Keyster M., Klein A. Plant biomarkers as early detection tools in stress management in food crops: a review. *Planta*. 2024;259(3):60. doi 10.1007/s00425-024-04333-1
- Ashraf M., Harris P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51:163-190. doi 10.1007/s11099-013-0021-6
- Bäurle I., Trindade I. Chromatin regulation of somatic abiotic stress memory. *J Exp Bot*. 2020;71(17):5269-5279. doi 10.1093/jxb/eraa098
- Browse J., Xin Z. Temperature sensing and cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol*. 2001;4:241-246. doi 10.1016/s1369-5266(00)00167-9
- Chen K., Li G.J., Bressan R.A., Song C.P., Zhu J.K., Zhao Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *J Integr Plant Biol*. 2020;62(1):25-54. doi 10.1111/jipb.12899
- Ding Y., Shi Y., Yang S. Regulatory networks underlying plant responses and adaptation to cold stress. *Annu Rev Genet*. 2024;58(1):43-65. doi 10.1146/annurev-genet-111523-102226
- Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum section Lycopersicon*). *Plants*. 2020;9(9):1169. doi 10.3390/plants9091169
- ElShamey E., Zeng Y., Ding Y., Yang J. Functional phytochemicals in tomatoes: biosynthesis, gene regulation, and human health implications. *Front Plant Sci*. 2025;16:1662388. doi 10.3389/fpls.2025.1662388
- Friedrich T., Faivre L., Bäurle I., Schubert D. Chromatin-based mechanisms of temperature memory in plants. *Plant Cell Environ*. 2019; 42(3):762-770. doi 10.1111/pce.13373
- Gao Y., Zhou X., Huang H., Wang C., Xiao X., Wen J., Wu J., Zhou S., de Dios V.R., Rodriguez L.G., Yao Y., Liu J., Deng H. ORANGE proteins mediate adaptation to high light and resistance to *Pseudomonas syringae* in tomato by regulating chlorophylls and carotenoids accumulation. *Int J Biol Macromol*. 2025;306(Pt.4):141739. doi 10.1016/j.ijbiomac.2025.141739
- Ikuyinminu E., Goñi O., Łangowski Ł., O'Connell S. Transcriptome, biochemical and phenotypic analysis of the effects of a precision



- engineered biostimulant for inducing salinity stress tolerance in tomato. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):6988. doi 10.3390/ijms24086988
- Jacques C., Salon C., Barnard R.L., Vernoud V., Prudent M. Drought stress memory at the plant cycle level: a review. *Plants (Basel).* 2021;10(9):1873. doi 10.3390/plants10091873
- Jansson S. A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 1999;4(6):236-240. doi 10.1016/s1360-1385(99)01419-3
- Kidokoro S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses. *Trends Plant Sci.* 2022;27(9):922-935. doi 10.1016/j.tplants.2022.01.008
- Klimmek F., Sjödin A., Noutsos C., Leister D., Jansson S. Abundantly and rarely expressed *Lhc* protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiol.* 2006;140(3):793-804. doi 10.1104/pp.105.073304
- Lan Y., Song Y., Zhao F., Cao Y., Luo D., Qiao D., Cao Y., Xu H. Phylogenetic, structural and functional evolution of the LHC gene family in plant species. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):488. doi 10.3390/ijms24010488
- Li Y., Cao T., Guo Y., Grimm B., Li X., Duanmu D., Lin R. Regulatory and retrograde signaling networks in the chlorophyll biosynthetic pathway. *J Integr Plant Biol.* 2025;67(4):887-911. doi 10.1111/jipb.13837
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15(12):550. doi 10.1186/s13059-014-0550-8
- Meng F., Ma M., Li S., Liang P., Liang Y., Shi H., Huang S., Su H., Deng Y., Akram M.A., Shen X., Feng R., Zhan X., Ma F. Genome-wide identification of light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHC) gene family in tomato and functional analysis of *SILhcb1.11* and *SIELIP1* under cold stress. *Genomics.* 2025;117(2):111022. doi 10.1016/j.ygeno.2025.111022
- Mesa T., Polo J., Arabia A., Caselles V., Munné-Bosch S. Differential physiological response to heat and cold stress of tomato plants and its implication on fruit quality. *J Plant Physiol.* 2022;268:153581. doi 10.1016/j.jplph.2021.153581
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep.* 2013;32(7):959-970. doi 10.1007/s00299-013-1418-1
- Neilson K.A., Mariani M., Haynes P.A. Quantitative proteomic analysis of cold-responsive proteins in rice. *Proteomics.* 2011;11(9):1696-1706. doi 10.1002/pmic.201000727
- Piechulla B., Merforth N., Rudolph B. Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol.* 1998;38(4):655-662. doi 10.1023/a:1006094015513
- Pietrzykowska M., Suorsa M., Semchonok D.A., Tikkanen M., Boekema E.J., Aro E.-M., Jansson S. The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2014;26(9):3646-3660. doi 10.1105/tpc.114.127373
- Soualiou S., Duan F., Li X., Zhou W. Nitrogen supply alleviates cold stress by increasing photosynthesis and nitrogen assimilation in maize seedlings. *J Exp Bot.* 2023;74(10):3142-3162. doi 10.1093/jxb/erad073
- Sreenivasulu N., Harshavardhan V.T., Govind G., Seiler C., Kohli A. Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene.* 2012; 506(2):265-273. doi 10.1016/j.gene.2012.06.076
- Tee E.E. Orange is the new green: Arabidopsis ORANGE represses chloroplast biogenesis. *Plant Cell.* 2019;31(12):2824-2825. doi 10.1105/tpc.19.00670
- Villagómez-Aranda A.L., Feregrino-Pérez A.A., García-Ortega L.F., González-Chavira M.M., Torres-Pacheco I., Guevara-González R.G. Activating stress memory: eustressors as potential tools for plant breeding. *Plant Cell Rep.* 2022;41(7):1481-1498. doi 10.1007/s00299-022-02858-x
- Xu C., Wang Y., Yang H., Tang Y., Liu B., Hu X., Hu Z. Cold acclimation alleviates photosynthetic inhibition and oxidative damage induced by cold stress in citrus seedlings. *Plant Signal Behav.* 2023; 18(1):2285169. doi 10.1080/15592324.2023.2285169
- Yamori W., Hikosaka K., Way D.A. Temperature response of photosynthesis in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth Res.* 2014;119(1-2):101-117. doi 10.1007/s11120-013-9874-6
- Yan J., Liu J., Yang S., Jiang C., Liu Y., Zhang N., Sun X., ... Liu Y., Sun Z., Qi M., Wang F., Li T. Light quality regulates plant biomass and fruit quality through a photoreceptor-dependent HY5-LHC/CYCB module in tomato. *Hortic Res.* 2023;10(12):uhad219. doi 10.1093/hr/uhad219
- Zhang Q., Ma C., Wang X., Ma Q., Fan S., Zhang C. Genome-wide identification of the light-harvesting chlorophyll a/b binding (Lhc) family in *Gossypium hirsutum* reveals the influence of *GhLhcb2.3* on chlorophyll a synthesis. *Plant Biol (Stuttg).* 2021;23(5):831-842. doi 10.1111/plb.13294
- Zhao S., Gao H., Luo J., Wang H., Dong Q., Wang Y., Yang K., Mao K., Ma F. Genome-wide analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding gene family in apple (*Malus domestica*) and functional characterization of *MdLhcb4.3*, which confers tolerance to drought and osmotic stress. *Plant Physiol Biochem.* 2020;154:517-529. doi 10.1016/j.plaphy.2020.06.022

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.03.2026. После доработки 12.05.2026. Принята к публикации 13.05.2026.



doi 10.18699/vjgb-26-87

# Пребридинговые исследования линий яровой мягкой пшеницы, несущих транслокацию T1BS.1BL-1S#F7L-1BL с геном *Lr51*

С.Н. Сибикеев , А.Е. Дружин , З.Е. Фитилева , И.В. Борисов <sup>1, 2</sup><sup>1</sup> Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия sibikeev\_sergey@mail.ru

**Аннотация.** Одним из эффективных генов устойчивости к возбудителю листовой ржавчины (*Puccinia triticina*) у мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) является ген *Lr51*, интродуцированный в геном мягкой пшеницы от *Aegilops speltoides* Tausch в составе транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL. Однако этот ген редко используют в практической селекции из-за опасения негативного влияния чужеродной транслокации на агрономические важные признаки. В данной работе представлены результаты пребридинговых исследований яровых линий мягкой пшеницы Л6 и Л7, несущих T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокацию, по сравнению с сортом-реципиентом Саратовская 68 и сортом-стандартом Саратовская 76 по комплексу селекционно значимых признаков. Наличие гена *Lr51* в генотипе линий Л6 и Л7 подтверждено ПЦР-анализом с использованием маркеров S30-13L и AGA7-759R. Фитопатологическая оценка линий Л6 и Л7 в условиях искусственного и естественного инфекционного фона к локальной популяции листовой ржавчины, распространенной в Саратовской области, показала их высокий уровень устойчивости в сравнении с сортом-реципиентом. По оценке цитологической стабильности линий, мейотический индекс составляет 98.2 и 99.7 у линий Л6 и Л7 соответственно. Наличие транслокации у Л6 и Л7 не влияло значимо на высоту растений и устойчивость к полеганию. У линий-аналогов продолжительность периода всходы–колошение оказалась на уровне сорта-реципиента и сорта-стандарта. По продуктивности зерна линии Л6 и Л7 также не отличались достоверно от сортов Саратовская 68 и Саратовская 76, по данным полевых испытаний за период 2023–2025 гг. Анализ структуры продуктивности главного колоса у линий Л6 и Л7 выявил отсутствие различий с сортом-реципиентом по всем показателям. По сравнению с сортом Саратовская 76 были достоверные различия в пользу линий-аналогов по плотности колоса, а у Л7 также по весу зерна с колоса и озерненности колоска. Наличие транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL у Л6 и Л7 незначимо повлияло на содержание белка, а также на качество муки и хлеба. Однако обе линии уступали сорту-реципиенту по таким признакам, как объем и пористость хлеба. Линии Л6 и Л7 уступали сорту Саратовская 76 по упругости, отношению упругости к растяжимости, объему хлеба, но превосходили по силе муки. В целом, с учетом цитологической стабильности и комплексу селекционно ценных показателей, влияние T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокации в генотипе сорта Саратовская 68 оценивается как нейтральное, а линии Л6 и Л7 имеют селекционную значимость по устойчивости к листовой ржавчине.

**Ключевые слова:** яровая мягкая пшеница; линии-аналоги сорта Саратовская 68; T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокация; устойчивость к листовой ржавчине; влияние на продуктивность и качество зерна

**Для цитирования:** Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Фитилева З.Е., Борисов И.В. Пребридинговые исследования линий яровой мягкой пшеницы, несущих транслокацию T1BS.1BL-1S#F7L-1BL с геном *Lr51*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(6):854-862. doi 10.18699/vjgb-26-87

**Финансирование.** Исследования выполнены при поддержке проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации FWNF-2025-0003.

## Prebreeding studies of spring bread wheat lines, carrying T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation with *Lr51* gene

S.N. Sibikeev , A.E. Druzhin , Z.E. Fitileva , I.V. Borisov <sup>1, 2</sup><sup>1</sup> Federal Agricultural Research Center for Southeast Regions, Saratov, Russia<sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia sibikeev\_sergey@mail.ru

**Abstract.** One of the sources of bread wheat resistance to the *Puccinia triticina* is the *Lr51* gene in the T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation, from *Aegilops speltoides* Tausch. However, it is little used in the practical breeding of *Triticum aestivum* L. The main reason is the fear of the negative impact of translocation on important agronomic features. This paper presents the results of pre-breeding studies of lines-analogues of spring bread wheat

cultivar Saratovskaya 68 – L6 and L7, carrying T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation, compared with the recipient – Saratovskaya 68 and the standard – Saratovskaya 76. The presence of the *Lr51* gene was confirmed by PCR analysis with markers 530-13L and AGA7-759R. Lines L6 and L7 are resistant to saratov populations of *P. tritici*. The lines-analogues are cytologically stable. The presence of translocation in L6 and L7 did not significantly influence for plant height and lodging resistance. In lines-analogues, the duration of the germination-earling period is at the level of recipient and standard cultivars. For grain productivity, lines L6 and L7 do not significantly differ from Saratovskaya 68. However, lines L6 and L7 surpassed Saratovskaya 76 in 2024, but there were no differences for 2023–2025 period. Analysis of the structure of the elements productivity of the main ear for average 2023–2025 period showed that at the lines L6 and L7 no differences with the cultivar-recipient for all traits. But comparisons with Saratovskaya 76, show significant differences in favor of lines with translocation in terms of ear density, while L7 also had significant differences for grain weight from the ear and number grains in spikelet. The presence of the T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation in L6 and L7 did not significantly affect the protein content, as well as the indicators of flour and bread, except for the volume and porosity of bread. Lines L6 and L7 were inferior to Saratovskaya 76 in terms of elasticity, the ratio of elasticity to extensibility (P/L), and the volume of bread, but surpassed the strength of flour (W). In general, in terms of cytological stability and the entire range of breeding-valuable indicators, the effect of T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation in the genotype of the Saratovskaya 68 is assessed as neutral, and lines L6 and L7 have breeding significance for leaf rust resistance.

**Key words:** spring bread wheat; lines-analogous of cultivar Saratovskaya 68; T1BS.1BL-1S#F7L-1BL; resistance to leaf rust; influence for grain productivity and bread making quality

**For citation:** Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Fitileva Z.E., Borisov I.V. Prebreeding studies of spring bread wheat lines, carrying T1BS.1BL-1S#F7L-1BL translocation with *Lr51* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(6):854-862. doi 10.18699/vjgb-26-87

## Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L. em. Thell) – одна из основных продовольственных культур. На долю пшеницы приходится свыше 27 % общего мирового производства зерна. Интенсивная селекция на повышение продуктивности этой культуры значительно обедняет ее генофонд по генам устойчивости к болезням и вредителям. Уязвимость (восприимчивость) сортов мягкой пшеницы к болезням приводит к огромным потерям урожая зерна и снижению его качества. Так, средние потери от листовой ржавчины в России и странах Зарубежья составляют 4–6 %, а в условиях эпифитотии этого патогена потери в урожае зерна могут достигать 50–70 % (Дымченко и др., 1990). В последние десятилетия для зоны Нижнего и Среднего Поволжья России отмечается повышение вредоносности спектра болезней мягкой пшеницы. В 2016 г. наблюдалась сильная эпифитотия стеблевой ржавчины, в 2017 г. сильная эпифитотия листовой ржавчины и септориоза листьев, в 2019 г. сильная эпифитотия желтой пятнистости листьев, в 2020 г. локальная, но сильная эпифитотия стеблевой ржавчины, в 2025 г. одновременные средние эпифитотии желтой и листовой ржавчины, мучнистой росы и желтой пятнистости. Таким образом, происходит постоянный прессинг на растения мягкой пшеницы грибных болезней, и значение повышения урожайности возделываемых растений за счет устойчивости к биотическим факторам, в число которых входит большая группа фитопатогенов, резко возрастает. Во избежание экономически значимых потерь от болезней мягкой пшеницы, в том числе и к видам ржавчин, необходима постоянная научно обоснованная селекция на устойчивость к патогенам. Эта работа должна быть основана на знании биологии патогена, его вирулентности, генетики устойчивости возделываемых сортов культурных растений и достаточном количестве и разнообразии генов устойчивости к патогенам, т.е. она должна быть опережающей (McIntosh, Brown, 1997). Наиболее трудно решаемой задачей является расширение

генетического разнообразия генов резистентности к патогенам. Так, в исследовании О.А. Барановой (2020) на наборе из 32 новых сортов мягкой пшеницы, занесенных в Государственный реестр селекционных достижений РФ за 2017–2018 гг., отмечено, что высокой эффективностью против возбудителя стеблевой ржавчины обладают лишь 11 сортов. Из них семь сортов защищены одним *Sr31* геном, три сорта комбинацией *Sr31*+*Sr57* и один сорт *Sr31*+*Sr28*. В работе Е.И. Гулятьевой и ее коллег (2025) на наборе 28 сортов озимой и 16 сортов яровой мягкой пшеницы, допущенных к использованию в 2024 г., установлено, что семь сортов озимой и пять сортов яровой мягкой пшеницы устойчивы к возбудителю листовой ржавчины, т.е. 25 и 37 % соответственно. Однако к возбудителю желтой ржавчины устойчив лишь один сорт озимой мягкой пшеницы.

В настоящее время эффективная устойчивость к патогенам у основной массы сортов пшеницы обусловлена не собственными генами резистентности, а наличием генов устойчивости интрогрессированных от диких и культурных сородичей мягкой пшеницы. Особо следует выделить вид *Aegilops speltoides* Tausch  $2n = 14$ , геном S (Schneider et al., 2008). Известно о 12 идентифицированных генах, перенесенных из данного вида, из них шесть генов устойчивости к листовой ржавчине (*Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66*), три к стеблевой ржавчине (*Sr32*, *Sr39*, *Sr47*) и три к мучнистой росе (*Pm12*, *Pm32*, *Pm53*) (grainsgenes.org/GG3/wgc, дата обращения 11 февраля 2026 г.). I.G. Adonina с коллегами (2012) идентифицировали транслокацию T5BS.5BL-5SL от *Ae. speltoides*, которая несет эффективный ген устойчивости к листовой ржавчине, обозначенный как *LrASP5*. Среди идентифицированных генов следует отметить ген *Lr51* (лабораторное обозначение *LrF7*), полученный от скрещивания сорта мягкой пшеницы Неерава с *Ae. speltoides* источник F, затем было проведено шесть беккроссов на сорт Неерава и получена высокоустойчивая к возбудителю листовой ржавчины линия F7 (Dvorak,

1977). У этой линии была локализована транслокация из хромосомы 1S *Ae. speltoides* в хромосому 1BL сорта Neerawa – T1BS.1BL-1S#F7L-1BL (Dvorak, Knott, 1980). В дальнейшем у одной производной линии от F7, F-7-3, была установлена интеркалярная транслокация от 1S в 1BL размером от 14 до 32 сМ, включающая локусы *XAg7* и *Xmwg710* (Helguera et al., 2005). Ген устойчивости к возбудителю листовой ржавчины *Lr51* полудоминантный и высокоэффективный как в России (Gulyaeva et al., 2024; Гульяева и др., 2025), так и за рубежом, в частности в США (Helguera et al., 2005). Несмотря на эффективность устойчивости, этот ген редко используют в коммерческих сортах мягкой пшеницы. Из доступных нам источников известно о десяти египетских сортах мягкой пшеницы, у которых идентифицирован ген *Lr51* (Abdelbacki et al., 2015). Среди российских сортов этот ген не идентифицирован (Gulyaeva et al., 2024). В Национальном центре зерна имени П.П. Лукьяненко (НЦЗ им. П.П. Лукьяненко) получен ряд линий с комбинациями *Lr51* с генами *Lr*: *Lr10*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr50*. Количество генов *Lr* в комбинациях колебалось от двух до пяти (Давоян, 2022). Причины редкого использования транслокации с *Lr51* не ясны. Есть предположение, что эта транслокация может отрицательно влиять на агрономически ценные признаки и в целом снижать продуктивность (Helguera et al., 2005). Однако данных о пребридинговых исследованиях транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL нет, информация о влиянии этой транслокации на продуктивность зерна и качественные показатели муки и хлеба отсутствуют. Цель исследования – по результатам трехлетнего исследования линий-аналогов яровой мягкой пшеницы с T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокацией изучить влияние транслокации на цитологическую стабильность, агрономически важные признаки, продуктивность зерна и качество муки и хлеба.

## Материал и методы

**Используемый материал** включал следующие образцы.

Сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 68, который относится к разновидности эритроспермум, ценный по качеству, устойчивый к засухе, восприимчивый к возбудителям листовой и стеблевой ржавчины, содержит неэффективный к возбудителю листовой ржавчины ген *Lr10* (Гульяева и др., 2020).

Сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 76 – стандарт, принятый Госкомиссией Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений по Саратовской области.

Л6 и Л7 – линии-аналоги яровой мягкой пшеницы сорта Саратовская 68. Родословная: Саратовская 68 / F-7-3 \*3// Саратовская 68. Линии-аналоги получены после скрещивания с линией F-7-3 и тройного беккроссирования с сортом Саратовская 68, где родословная почти изогенной линии F-7-3 = Neerawa\*6/*Triticum speltoides*, содержит транслокацию T1BS.1BL-1S#F7L-1BL с геном *Lr51*. Линия F-7-3 была любезно предоставлена доктором биологических наук Е.И. Гульяевой (ВИЗР, Санкт-Петербург, Пушкино). Данные линии относятся к разновидности

эритроспермум, высокоустойчивы к возбудителю листовой ржавчины.

**Цитогенетические исследования.** Цитологическую стабильность оценивали при изучении поведения хромосом в микроспорогенезе в мейозе. Стадии мейоза в микроспорогенезе изучали на временных давленных препаратах пыльников. Колосья линий Л6 и Л7 срезали до выхода из листовой оболочки и фиксировали в смеси 96 % этанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Через сутки после фиксации материал переносили в 70 % этиловый спирт, где он хранился до проведения анализа при  $t = +2-4$  °С. В качестве красителя использовали реактив Шиффа. Для каждой линии проанализированы 100–200 микроспороцитов стадий мейоза (метафаза I и II, анафаза I и II, телофаза I и II, тетрады). Слайды проанализированы на микроскопе Axio Scope A 1 (Carl Zeiss) с объективами N-ACHROPLAN 40x/0,65 и N-ACHROPLAN 100x/1,25 0;1.

**Фитопатологический анализ.** В полевых условиях устойчивость к возбудителю листовой ржавчины оценивали по шкале Mains, Jackson (1926), где: 0 – отсутствие симптомов; 0; – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом; 3 – пустулы среднего размера без некроза; 4 – крупные пустулы без некроза; X – пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы. Растения, поражение которых составляло 0–2 балла, относили к устойчивым (R), а 3, 4 и X (S) – к восприимчивым. Степень поражения ржавчиной (%) оценена по шкале, предложенной в работе (Peterson et al., 1948).

Для лабораторной оценки использовали сборные саратовские популяции *Puccinia triticina* с искусственно увеличенным присутствием патотипа *pp19*, вирулентного к гену *Lr19*. Проростки (фаза трех листьев), выращенные в сосудах с почвой, опрыскивали водной суспензией спор популяции с добавлением детергента Твин 80. Концентрация суспензии составляла 1 мг инокулюма на 1 мл воды. После заражения растений создавали темновую стадию на 20 ч со 100 % относительной влажностью, затем выращивали проростки при температуре 20–22 °С, фотопериод 16 ч день/8 ч ночь. Тип реакции пшеницы на патоген определяли по шкале Mains, Jackson (1926).

**Молекулярно-генетический анализ.** Для ПЦР-анализа ДНК выделяли из пятидневных проростков пшеницы методом с использованием цетилтриметиламмонийбромида (CTAB) (Murray, Thompson, 1980). Для идентификации гена устойчивости *Lr51* применяли CAPS-маркер для гена AGA7, расположенного в транслокации *Ae. speltoides*, содержащей *Lr51*. Были использованы праймеры S30-13L 5'-GCATCAACAAGATATTCGTTATGACC-3' и AGA7-759R 5'-TGGCTGCTCAGAAAAGTGGACC-3', предложенные в работе (Helguera et al., 2005). Амплификацию проводили на амплификаторах T100 Thermal Cycler (BioRad). Рестрикция – с использованием эндонуклеазы PstI (SibEnzyme). Продукты амплификации разделяли в 2 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Положительным контролем служила почти изогенная линия F-7-3, а негативным контролем – сорт-реципиент

**Таблица 1.** Гидротермические коэффициенты по метеостанции г. Саратов (ФАНЦ Юго-Востока) за 2023–2025 гг.

| Метеостанция<br>(ФАНЦ Юго-Востока, Саратов) | 2023 г. |     |     |      | 2024 г. |     |     |     | 2025 г. |     |     |
|---------------------------------------------|---------|-----|-----|------|---------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|
|                                             | V       | VI  | VII | VIII | IV      | V   | VI  | VII | V       | VI  | VII |
| Гидротермический коэффициент                | 0.8     | 1.1 | 0.6 | 0.4  | 0.3     | 0.2 | 0.8 | 0.1 | 1.1     | 0.8 | 0.5 |

Примечание. IV – апрель, V – май, VI – июнь, VII – июль, VIII – август.

Саратовская 68. В качестве маркера молекулярного веса применяли GeneRuler™ 100bp DNA Ladder («Евроген»). ПЦР ставили в двух повторностях.

Продуктивность зерна, физические и хлебопекарные свойства теста и хлеба у линий Л6, Л7 и сорта-стандарта Саратовская 76 оценивали в 2023–2025 гг. Экспериментальный материал рандомизированно высевался на делянках площадью 7 м<sup>2</sup> в трехкратной повторности на экспериментальном поле «ФАНЦ Юго-Востока» (Саратов). Норма высева 400 зерен на 1 м<sup>2</sup>. Кроме фенологических наблюдений и прямой оценки урожайности зерна, исследовали элементы продуктивности главного колоса: длину колоса, количество колосков и зерен, вес зерна с колоса, плотность колоса, озерненность колоска (как обобщенный показатель фертильности), которые определяли у 15 колосьев изучаемых линий и сорта-стандарта. Качество муки и хлеба оценивали по содержанию сырой клейковины, крепость которой определяли на измерителе деформации клейковины (ИДК-3М), а также по показателям альвеографа Шопена (Chopin Technologies) с выпечкой опытных образцов хлебцев. Содержание белка в зерне урожаев 2023–2025 гг. определяли на анализаторе зерна Foss Infratec TM 1241 (Foss Analytical A/S).

Метеорологическая характеристика лет выращивания по гидротермическому коэффициенту (ГТК) Селянинова ([www.agrometeo.online/articles/gtk.htm](http://www.agrometeo.online/articles/gtk.htm), дата обращения 26 января 2026) по месяцам вегетационного периода приведена в табл. 1. Из трех лет исследований по метеоусловиям наиболее благоприятными были 2023 и 2025 гг. Во все три года исследований наблюдались эпифитотии листовой ржавчины, наибольшее развитие патогена отмечено в вегетационные сезоны 2023 и 2025 гг.

Полученные данные по линиям Л6 и Л7, сорту-реципиенту и сорту-стандарту Саратовская 76 подвергли одно-

факторному дисперсионному анализу со множественными сравнениями по Дункану с использованием пакета селекционно-генетических программ «Agros-2.10».

Результаты

Цитологическая стабильность линий Л6 и Л7

Для оценки стабильности мейоза используют интегральный показатель – мейотический индекс, который представляет собой отношение (в %) нормальных тетрад к общему числу изученных клеток. В ходе исследований установлено: у Л6 мейотический индекс равен 98,2 %, у Л7 – 99,0 %, в то время как у сорта-реципиента Саратовская 68 – 98,8 %, т. е. между линиями и реципиентом по этому показателю не было различий. При мейотическом индексе 90 % и выше растение считается цитологически стабильным, т. е. обе исследуемые линии стабильны. В более ранних стадиях мейоза у обеих линий выявлены две хромосомы, не включенные в ядра в телофазе 1 в количестве 0,07 %. Среди одноядерной пыльцы у Л6 и Л7 обнаружена микропыльца: у Л6 и Л7 – 0,02 %, у Саратовской 68 – 0,01 %.

Фитопатологический анализ линий Л6 и Л7 на устойчивость к возбудителю листовой ржавчины. Идентификация гена устойчивости к возбудителю листовой ржавчины *Lr51* с использованием ДНК маркеров S30-13L и AGA7-759R

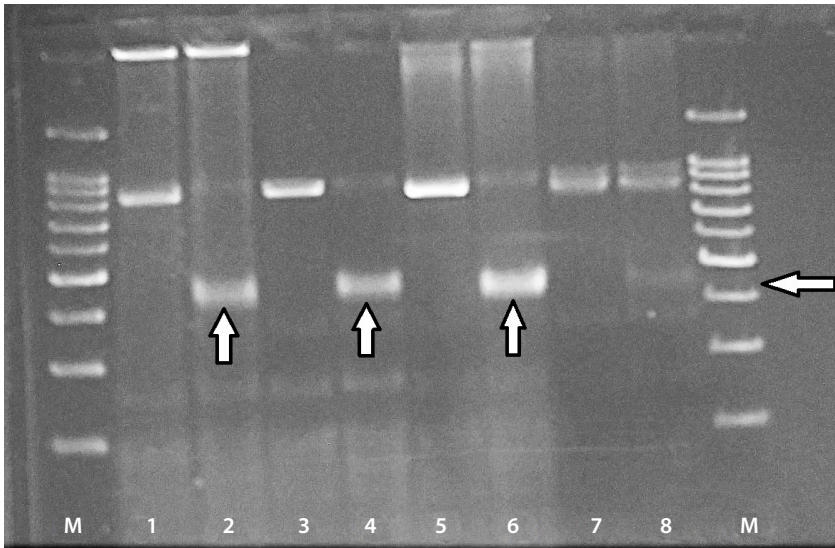
Линии Л6 и Л7 показали высокую устойчивость к *P. tritici* в 2023–2025 гг. как при искусственном заражении, так и при естественных эпифитотиях патогена (табл. 2). Учитывая, что при искусственном заражении *P. tritici* стадия растений была три листа, а при оценках в полевых условиях – молочная или молочно-восковая спелость, можно говорить о ювенильном характере действия гена устой-

**Таблица 2.** Характеристика линий яровой мягкой пшеницы Л6 и Л7, сорта-реципиента Саратовская 68 и сорта-стандарта Саратовская 76 по устойчивости к *P. tritici* в лаборатории (искусственное заражение) и поле (естественные эпифитотии)

| Сорт, линия    | Тип реакции на <i>P. tritici</i>        |      |      |                                  |      |      |
|----------------|-----------------------------------------|------|------|----------------------------------|------|------|
|                | в лаборатории (искусственное заражение) |      |      | в поле (естественные эпифитотии) |      |      |
|                | 2023                                    | 2024 | 2025 | 2023                             | 2024 | 2025 |
| Саратовская 68 | 3                                       | 3    | 3    | 3/20                             | 3/10 | 3/5  |
| Л6             | 0;                                      | 0; 1 | 0; 1 | 0; 1                             | 0;   | 0;   |
| Л7             | 0;                                      | 0; 1 | 0; 1 | 0; 1                             | 0;   | 0;   |
| Саратовская 76 | 3                                       | 3    | 3    | 3/20                             | 3/10 | 3/5  |

Примечание. Лабораторная оценка в стадии трех листьев. При естественных эпифитотиях *P. tritici* оценка проводилась на экспериментальном поле ФАНЦ Юго-Востока (Саратов).





Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции с использованием праймеров S30-13L и AGA7-759R, диагностирующих ген *Lr51*.  
М – маркер длин ДНК, 100 п.н. (Евроген). Продукт амплификации с маркером размером 819 п.н. определен у линии F-7-3 *Lr51* (1) и у линий-аналогов Л6 (3), Л7 (5). Дорожки 2, 4, 6 – продукты рестрикции PstI ампликонов соответственно F-7-3 *Lr51*, Л6 и Л7. Дорожка 7 – сорт-реципиент Саратовская 68. Дорожка 8 – продукт рестрикции PstI ампликона сорта-реципиента Саратовская 68. Стрелками указано положение диагностических фрагментов – продуктов рестрикции ампликонов маркера размером 422 + 397 п.н.

чивости у линий Л6 и Л7. Сорт-реципиент Саратовская 68 и сорт-стандарт Саратовская 76 были восприимчивы к возбудителю листовой ржавчины. Результаты идентификации гена *Lr51* / ПЦР анализом с использованием ДНК маркеров S30-13L и AGA7-759R в анализируемых линиях Л6 и Л7 показали его присутствие (см. рисунок).

**Фенология и показатели продуктивности зерна, физических и хлебопекарных свойств теста и хлеба у линий Л6 и Л7, сорта-реципиента Саратовская 68 и сорта-стандарта Саратовская 76**

В табл. 3 приведены показатели периода всходы–колошение, высоты растений, устойчивости к полеганию в вегетационные сезоны в 2023–2025 гг. у Л6, Л7 и сортов – реципиента и стандарта. За вегетационные сезоны 2023–2025 гг. период всходы–колошение у линий Л6 и Л7 и

сортос Саратовская 68 и Саратовская 76 практически одинаков и различия были не значимы. Таким образом, транслокация T1BS.1BL-1S#F7L-1BL почти не влияет на период всходы–колошение. По высоте растений в 2023 и 2025 гг. линии Л6 и Л7 незначимо различались с сортами Саратовская 68 и Саратовская 76, но в 2024 г. линия Л6 значимо превзошла оба сорта, а в 2025 г. различия были между линиями: Л7 превысила Л6. В среднем за период 2023–2025 гг. по высоте растений различий между сортами (Саратовская 68 – 86 см, Саратовская 76 – 85 см) и линиями (Л6 – 88 см, Л7 – 89 см), а также линиями между собой не было. Таким образом, транслокация T1BS.1BL-1S#F7L-1BL в сорте Саратовская 68 не привела к значимому изменению высоты растений. Высота растений влияет на устойчивость растений к полеганию. В наших исследованиях Л7 по этому признаку значимо уступила обоим

**Таблица 3.** Период всходы–колошение, высота растений, устойчивость к полеганию у Л6, Л7 и сортов Саратовская 68 и Саратовская 76 за вегетационные сезоны 2023–2025 гг.

| Сорт, линия           | Период всходы–колошение, дни |      |      | Высота растений, см |      |       | Устойчивость к полеганию, балл |      |      |
|-----------------------|------------------------------|------|------|---------------------|------|-------|--------------------------------|------|------|
|                       | 2023                         | 2024 | 2025 | 2023                | 2024 | 2025  | 2023                           | 2024 | 2025 |
| Саратовская 68 rec    | 47                           | 41   | 45   | 89.7                | 68.3 | 100.0 | 3.7                            | 4.1  | 4.1  |
| Л6                    | 47                           | 41   | 44   | 89.0                | 75.5 | 99.0  | 3.6                            | 4.1  | 4.2  |
| Л7                    | 47                           | 41   | 45   | 91.2                | 73.0 | 104.0 | 3.0                            | 4.0  | 4.2  |
| НСР <sub>0.5</sub> *  | NS                           | NS   | NS   | NS                  | 5.0  | 4.0   | 0.5                            | NS   | NS   |
| Саратовская 76 st     | 47                           | 41   | 45   | 90.0                | 66.0 | 100.0 | 3.6                            | 4.3  | 4.0  |
| НСР <sub>0.5</sub> ** | NS                           | NS   | NS   | NS                  | 5.2  | 4.0   | 0.5                            | 0.2  | NS   |

Примечание. Наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л6, Л7 и: \* Саратовской 68, \*\* Саратовской 76. NS здесь и в табл. 4–6 – различия отсутствуют.

**Таблица 4.** Урожайность и масса 1000 зерен у линий яровой мягкой пшеницы Л6, Л7 и сортов Саратовская 68, Саратовская 76 за вегетационные сезоны 2023–2025 гг.

| Сорт, линия           | Масса 1000 зерен, г |      |      |         | Урожайность зерна, т/га |       |       |         |
|-----------------------|---------------------|------|------|---------|-------------------------|-------|-------|---------|
|                       | 2023                | 2024 | 2025 | среднее | 2023                    | 2024  | 2025  | среднее |
| Саратовская 68        | 36.1                | 32.7 | 35.5 | 34.8    | 3.142                   | 2.238 | 3.551 | 2.977   |
| Л6                    | 37.0                | 36.3 | 34.6 | 36.0    | 2.990                   | 2.713 | 3.250 | 2.984   |
| Л7                    | 37.8                | 33.6 | 32.1 | 34.5    | 3.244                   | 2.596 | 3.427 | 3.022   |
| НСР <sub>0.5</sub> *  | NS                  | 3.1  | 3.0  | NS      | NS                      | NS    | NS    | NS      |
| Саратовская 76        | 38.6                | 35.4 | 35.9 | 36.6    | 2.776                   | 2.042 | 3.492 | 2.770   |
| НСР <sub>0.5</sub> ** | NS                  | NS   | 3.0  | NS      | NS                      | 0.501 | NS    | NS      |

Примечание. Наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л6, Л7 и: \* Саратовской 68, \*\* Саратовской 76.

**Таблица 5.** Показатели элементов продуктивности главного колоса у линий яровой мягкой пшеницы Л6, Л7, сорта-реципиента Саратовская 68 и сорта-стандарта Саратовская 76 в среднем за вегетационные сезоны 2023–2025 гг.

| Сорт, линия           | Длина колоса, мм | Количество, шт. |                | Плотность колоса | Вес зерна с колоса, г | Озерненность колоска, шт. |
|-----------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------------|---------------------------|
|                       |                  | колосков        | зерен с колоса |                  |                       |                           |
| Л6                    |                  |                 |                |                  |                       |                           |
| Саратовская 68        | 85.97            | 16.97           | 42.70          | 1.87             | 1.63                  | 2.52                      |
| Л6                    | 81.53            | 16.43           | 40.40          | 1.90             | 1.50                  | 2.46                      |
| НСР <sub>0.5</sub> *  | NS               | NS              | NS             | NS               | NS                    | NS                        |
| Саратовская 76        | 91.37            | 16.60           | 40.30          | 1.70             | 1.42                  | 2.40                      |
| НСР <sub>0.5</sub> ** | NS               | NS              | NS             | 0.176            | NS                    | NS                        |
| Л7                    |                  |                 |                |                  |                       |                           |
| Саратовская 68        | 85.97            | 16.97           | 42.70          | 1.87             | 1.63                  | 2.52                      |
| Л7                    | 85.63            | 17.27           | 44.67          | 1.90             | 1.73                  | 2.58                      |
| НСР <sub>0.5</sub> *  | NS               | NS              | NS             | NS               | NS                    | NS                        |
| Саратовская 76        | 91.37            | 16.60           | 40.3           | 1.70             | 1.42                  | 2.40                      |
| НСР <sub>0.5</sub> ** | NS               | NS              | NS             | 0.076            | 0.252                 | 0.152                     |
| Л6 и Л7               |                  |                 |                |                  |                       |                           |
| Л6                    | 81.53            | 16.43           | 40.4           | 1.90             | 1.50                  | 2.46                      |
| Л7                    | 85.63            | 17.27           | 44.67          | 1.90             | 1.73                  | 2.58                      |
| НСР <sub>0.5</sub>    | NS               | NS              | NS             | NS               | NS                    | NS                        |

Примечание. Наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между линией и: \* сортом-реципиентом Саратовская 68; \*\* сортом-стандартом Саратовская 76.

сортам и Л6 в вегетационном сезоне 2023 г. В 2024 г. Л7 уступила сорту Саратовская 76. В 2025 г. различий между линиями и сортами не было. В среднем за период 2023–2025 гг. по устойчивости к полеганию различий между сортами (Саратовская 68 – 4.0 и Саратовская 76 – 4.0) и линиями (Л6 – 4.0 и Л7 – 3.7) и линиями между собой не было. Тем не менее наблюдается снижение устойчивости к полеганию у Л7. Сравнение Л6 и Л7 по продуктивности зерна и ее элементов у главного колоса позволило выявить влияние транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL на эти признаки (табл. 4 и 5).

Установлено, что наличие транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL как у Л6, так и у Л7 в годы исследований незначимо влияло на урожайность зерна по сравнению с реципиентом Саратовская 68 (см. табл. 4). Однако на-

блюдались различия по сравнению с стандартом Саратовская 76 в вегетационный сезон 2024 г., сорт значимо уступил обеим линиям (см. табл. 4). По данным ГТК, в вегетационный сезон 2024 г. наблюдалась засуха от сильной до слабой степени (см. табл. 1). Таким образом, есть основания предположить, что Л6 и Л7 с T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокацией более засухоустойчивы, чем стандарт Саратовская 76, но одного уровня с сортом-реципиентом Саратовская 68. Одним из факторов, который влияет на продуктивность зерна, является масса 1000 зерен. В среднем за период 2023–2025 гг. не было значимых различий по этому признаку между линиями Л6, Л7 и сортами Саратовская 68 и Саратовская 76, но были различия по отдельным годам. Л6 превзошла по массе 1000 зерен сорт-реципиент Саратовская 68 в 2024 г., а Л7 уступила и Сара-

**Таблица 6.** Показатели качества муки и хлеба у линий яровой мягкой пшеницы Л6, Л7, сорта-реципиента Саратовская 68 и сорта-стандарта Саратовская 76 в среднем за вегетационные сезоны 2023–2025 гг.

| Сорт, линия           | Содержание в зерне |              |               | Показатели альвеографа |                                              | Показатели оценки хлеба |                   |                 |             |
|-----------------------|--------------------|--------------|---------------|------------------------|----------------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------------|
|                       | белка, %           | клейковины % | ИДК 3, ед. п. | упругость теста Р, мм  | отношение упругости теста к растяжимости P/L | сила муки W, ед. а.     | объем хлеба V, мл | пористость балл | цвет мякиша |
| Саратовская 68        | 16.1               | 30.23        | 69.4          | 71.0                   | 0.81                                         | 301                     | 712               | 4.8             | Белый       |
| Л6                    | 16.6               | 31.07        | 63.9          | 84.9                   | 1.00                                         | 333                     | 597               | 3.8             |             |
| Л7                    | 16.3               | 31.63        | 65.5          | 74.5                   | 0.91                                         | 320                     | 602               | 4.3             |             |
| НСР <sub>0.5</sub> *  | NS                 | NS           | NS            | 9.1                    | NS                                           | NS                      | 94                | 0.5             | –           |
| Саратовская 76        | 16.3               | 31.1         | 73.9          | 98.0                   | 1.57                                         | 270                     | 707               | 4.5             | Белый       |
| НСР <sub>0.5</sub> ** | NS                 | NS           | 6.1           | 10.1                   | 0.6                                          | 35                      | 96                | NS              | –           |

Примечание. Наименьшая существенная разница для 5 % уровня значимости между Л6, Л7 и: \* сортом-реципиентом Саратовская 68; \*\* сортом-стандартом Саратовская 76.

товской 68, и Саратовской 76 в 2025 г. (см. табл. 4). Анализ элементов продуктивности главного колоса выявил, что Л6 и Л7 с T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокацией по всем показателям значимо не отличались от сорта-реципиента Саратовская 68. Таким образом, есть основание оценить влияние T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокации на параметры продуктивности главного колоса как нейтральное. Однако выявлены значимые различия между сортом-стандартом Саратовская 76 по плотности колоса как у Л6, так и у Л7. Кроме того, Л7 значимо превысила сорт-стандарт по весу зерна с колоса и озерненности колоска. Между собой линии Л6 и Л7 по элементам продуктивности главного колоса значимо не различались (см. табл. 5).

По качеству муки и хлеба у изучаемых линий получены следующие результаты. По содержанию белка в зерне Л6 и Л7 значимо не отличались ни от сорта-реципиента, ни от сорта-стандарта. Так же не обнаружены значимые различия по содержанию и крепости клейковины по сравнению с сортом-реципиентом Саратовская 68. Однако клейковина у линий Л6 и Л7 по показателям прибора ИДК-3М была более крепкой по сравнению с сортом-стандартом Саратовской 76 (табл. 6).

По данным альвеографа, у Л6 значимо более высокая упругость теста (Р) по сравнению с сортом-реципиентом и линией Л7, но Л7 по этому показателю не отличалась от Саратовской 68. По отношению упругости к растяжимости (P/L) и силе муки (W) линии Л6 и Л7 значимо не отличались от сорта-реципиента, однако достоверно снизили объем хлеба, а Л6 и оценку пористости хлеба. Сравнение линий Л6, Л7 и сорта Саратовская 76 по данным альвеографа и показателям хлебопекарной оценки выявило больше различий. По упругости обе линии уступили сорту-стандарту, по отношению упругости к растяжимости Л6 не отличалась, но Л7 имела более низкие значения. По силе муки обе линии значимо превысили сорт Саратовская 76, но имели достоверно более низкий объем хлеба, и по пористости мякиша различий не было. Транслокация T1BS.1BL-1S#F7L-1BL у линий Л6 и Л7 не изменила цвет мякиша хлеба, обе линии, как и сорт-реципиент, и сорт-стандарт, имели мякиш белого цвета (см. табл. 6).

**Обсуждение**

Дикие родственники мягкой пшеницы обладают многими генами, представляющими агрономический интерес, и могут быть ценными источниками устойчивости к болезням, насекомым и экстремальным факторам окружающей среды. В первую очередь это касается видов близко родственных мягкой пшенице, к которым относится *Ae. speltooides* Tausch  $2n = 14$ , геном S. Этот вид принадлежит к вторичному генпулу мягкой пшеницы (Shneider et al., 2008). В целом вид привлекает своим иммунитетом к ряду заболеваний и большей способностью к рекомбинагенозу с хромосомами мягкой пшеницы. Повышенная способность к рекомбинагенозу обусловлена как близостью S и V геномов, так и наличием в S геноме генов супрессоров системы генов парной конъюгации (*Ph*) и допускающих синапсис гомеологичных хромосом. Как уже отмечено выше, в Каталоге генных символов пшеницы зарегистрировано 12 генов, перенесенных из этого вида, из них шесть генов устойчивости к листовой ржавчине, три к стеблевой ржавчине и три к мучнистой росе (grainsgenes.org/GG3/wgc, дата обращения 11 февраля 2026 г.). В процесс рекомбинагеноза с хромосомами мягкой пшеницы были вовлечены 1S, 2S, 3S, 5S, 6S и 7S хромосомы *Ae. speltooides*. Большая часть перенесенных генов устойчивости к патогенам от этого вида включала участки 2S хромосомы (*Lr35*, *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*). От остальных хромосом *Ae. speltooides* было один–два переноса с генами устойчивости. Из хромосомы 1S были перенесены транслокации в 1В хромосому: 1BL.1SS (*Pm32*) и 1BS.1BL-1S#F7L-1BL (*Lr51*). Таким образом, в обмены были вовлечены оба плеча хромосомы 1S (grainsgenes.org/GG3/wgc, дата обращения 11 февраля 2026 г.).

В наших исследованиях на основе линий-аналогов яровой мягкой пшеницы сорта Саратовская 68 с транслокацией 1BS.1BL-1S#F7L-1BL с геном *Lr51* изучалась цитологическая стабильность, определялись влияние на морфо-биологические и фенологические признаки, эффективность защиты против возбудителя листовой ржавчины, а также продуктивность зерна и показатели качества муки и хлеба. К сожалению, из доступных нам источников не



удалось найти сообщения о подобных исследованиях. В связи с этим сравнение результатов наших исследований с результатами других работ невозможны.

Одним из факторов, ограничивающим практическое применение интрогрессивных линий, является их нестабильность, ведущая к быстрой потере чужеродного генетического материала. В основе этой нестабильности лежат нарушения мейотического цикла гибридных растений, вызывающие формирование нефункциональных гамет (Орловская и др., 2015). Большой стабильностью отличаются линии с чужеродными транслокациями, полученные методом индуцированных гомеологичных обменов или спонтанных обменов между хромосомами чужого вида и хромосомами мягкой пшеницы (Sears, 1972; Friebe et al., 2000). Используемая нами транслокация T1BS.1BL-1S#F7L-1BL с геном *Lr51* в исходной линии F-7-3 получена в ходе скрещиваний (беккроссирования) сорта Neerawa с *Ae. speltoides* источник F, т. е. имеются основания предполагать гомеологичный обмен хромосомы эгилопса и мягкой пшеницы. Известно, что сам вид *Ae. speltoides* несет как гены/ген, подавляющие действие генов *Ph* (парной конъюгации), так и гаметоцидные гены, которые влияют на микроспорогенез и жизнеспособность пыльцы, но локализация этих генов не затрагивает 1S хромосому (grainsgenes.org/GG3/wgc, дата обращения 11 февраля 2026 г.). В связи с этим были основания ожидать у линий Л6 и Л7 незначительные нарушения цитологической стабильности по сравнению с сортом-реципиентом Саратовская 68. В результате нашего изучения цитологической стабильности у линий Л6 и Л7 определен мейотический индекс 98.2 и 99.0 % соответственно, а у сорта-реципиента Саратовская 68 – 98.8 %. Таким образом, линии Л6 и Л7 цитологически стабильны.

Ген *Lr51* был высокоэффективен против саратовских популяций *P. triticina* в вегетационные сезоны 2023–2025 гг., что совпадает с данными Е.И. Гульяевой о эффективности этого гена в РФ (Gulyaeva et al., 2024). Наличие транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL у Л6 и Л7 незначимо влияло на высоту растений и устойчивость к полеганию как по сравнению с сортом-реципиентом Саратовская 68, так и со стандартом Саратовская 76. Однако следует отметить снижение устойчивости к полеганию у Л7 в вегетационные сезоны 2023 и 2024 гг. У линий-аналогов Саратовской 68 продолжительность периода всходы–колошение была на уровне сорта-реципиента и сорта-стандарта. По продуктивности зерна у линий с транслокацией T1BS.1BL-1S#F7L-1BL не было значимых различий с сортом-реципиентом как по отдельным годам, так и в среднем за период 2023–2025 гг. Однако по сравнению с сортом-стандартом Саратовская 76 линии Л6 и Л7 значимо превосходили Саратовскую 76 в 2024 г., но не было различий в 2023 и 2025 г. и в среднем за период 2023–2025 гг. Подробный анализ структуры продуктивности главного колоса в среднем за 2023–2025 гг. у линий с транслокацией T1BS.1BL-1S#F7L-1BL выявил отсутствие различий с сортом-реципиентом Саратовская 68 по всем показателям. Тем не менее по сравнению с сортом-стандартом Саратовская 76 были значимые различия в пользу линий с транслокацией по

плотности колоса, а у Л7 также по весу зерна с колоса и озерненности колоска. Наличие транслокации T1BS.1BL-1S#F7L-1BL у Л6 и Л7 незначимо повлияло на содержание белка, а также показатели муки и хлеба, кроме объема и пористости хлеба. Обе линии уступили сорту-реципиенту. По сравнению с сортом-стандартом Саратовская 76, результаты были неоднозначные. Линии с транслокацией уступили Саратовской 76 по упругости, отношению упругости к растяжимости (P/L), объему хлеба, но превосходили по силе муки (W). Исходя из вышеизложенных результатов предположение М. Helguera с коллегами (2005) о негативном влиянии транслокации с *Lr51* геном, связанные с ее большими размерами, не подтверждается. Тем не менее возможно взаимодействие T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокации с генотипами-реципиентами, что изменит влияние на хозяйственно ценные признаки. Различные эффекты наблюдались у почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с 7DL-7Ae#1L-7Ae#1S транслокацией с геном *Lr29* на сортах Саратовская 68 и Саратовская 70 (Sibikeev et al., 2022).

## Заключение

В целом по цитологической стабильности и всему комплексу селекционно ценных показателей влияние T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокации в генотипе сорта Саратовская 68 оценивается как нейтральное. Более того, эта транслокация не снизила продуктивность зерна в засушливых условиях 2024 г., т. е. ее присутствие не понижает засухоустойчивость. Сравнение с сортом-стандартом Саратовская 76 выявило достаточную селекционную значимость Л6 и Л7 с T1BS.1BL-1S#F7L-1BL транслокацией в генотипе Саратовской 68.

## Список литературы / References

- Баранова О.А. Молекулярная идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине у новых допущенных к использованию сортов пшеницы. *Вестник защиты растений*. 2020;103(2):113-118. doi 10.31993/2308-6459-2020-103-2-4936
- [Baranova O.A. Molecular identification of stem rust resistance genes in new regional wheat varieties. *Plant Protection News*. 2020; 103(2):113-118. doi 10.31993/2308-6469-2020-103-2-4936 (in Russian)]
- Гульяева Е.И., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Шайдаюк Е.Л. Расширение генетического разнообразия сортов яровой мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.) в Нижнем Поволжье. *Сельскохозяйственная биология*. 2020; 55(1):27-44. doi 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus
- [Gulyaeva E.I., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Shaydayuk E.L. Enlargement of genetic diversity of spring bread wheat resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Erics.) in Lower Volga region. *Agric Biol*. 2020;55(1):27-44. doi 10.15389/agrobiology.2020.1.27rus (in Russian)]
- Гульяева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Зуев Е.В. Потенциал современных российских сортов озимой и яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) для генетической защиты от бурой и желтой ржавчины. *Сельскохозяйственная биология*. 2025;60(3):485-502. doi 10.15389/agrobiology.2025.3.485rus
- [Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Zuev E.V. The potential of modern Russian winter and spring wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties for genetic protection against leaf and yellow rust. *Agric Biol*. 2025;60(3):485-502. doi 10.15389/agrobiology.2025.3.485rus (in Russian)]



- Давоян Э.Р. Создание нового, генетически разнообразного исходного материала для селекции мягкой пшеницы на основе методов хромосомной инженерии и ДНК-маркирования: Диссертация ... д-ра биол. наук. Краснодар, 2022  
[Davoyan E.R. Creation of a new, genetically diverse source material for breeding bread wheat based on methods of chromosomal engineering and DNA labeling: Dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences. Krasnodar, 2022 (in Russian)]
- Дымченко А.М., Назарова Л.Н., Жемчужина А.И. Перспективные и районированные сорта озимой пшеницы с разной устойчивостью к бурой ржавчине. *Селекция и семеноводство*. 1990;(5):16-18  
[Dymchenko A.M., Nazarova L.N., Zhemchuzhina A.I. Promising and zoned varieties of winter wheat with different resistance to brown rust. *Seleksiya i Semenovodstvo*. 1990;(5):16-18 (in Russian)]
- Орловская О.А., Леонова И.Н., Адонина И.Г., Салина Е.А., Хотылева Л.В., Шумный В.К. Молекулярно-цитогенетический анализ линий тритикале и пшеницы с интрогрессиями генетического материала видов трибы Triticeae. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(5):552-560. doi 10.18699/VJ15.072  
[Orlovskaya O.A., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A., Khotyleva L.V., Shumny V.K. Molecular-cytogenetic analysis of triticale and wheat lines with introgressions of the tribe Triticeae species genetic material. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2015;19(5):552-560. doi 10.18699/VJ15.072 (in Russian)]
- Abdelbacki A.M.M., Omara R.I., Soliman N.E.K., Najeeb M.A. Molecular markers identification of leaf rust resistant genes Lr19, Lr21, Lr24, Lr47 and Lr51 in selected Egyptian wheat cultivars. *Int J Phytopathol*. 2015;04(02):55-62. doi 10.33687/phytopath.004.02.0873
- Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Yu.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust-resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltoides* Tausch. Genetic material. *Russ J Genet*. 2012;48(4):404-409. doi 10.113/S1022795412020020
- Dvorak J. Transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to *Triticum aestivum*. *Can J Genet Cytol*. 1977;19:133-141
- Dvorak J., Knott D.R. Chromosome location of two leaf rust resistance genes transferred from *Triticum speltoides* to *T. aestivum*. *Can J Genet Cytol*. 1980;22:381-389
- Friebe B., Raupp W.J., Gill B.S. Wheat – alien translocation lines. *Annu Wheat Newsltt*. 2000;46. Available: <https://graingenes.org/ggpages/awn/46/>
- Gulyaeva E., Shaydayuk E., Shreyder E., Kushnirenko I., Shamanin V. Genetic diversity of promising spring wheat accessions from Russia and Kazakhstan for rust resistance. *Plants*. 2024;13(17):2469. doi 10.3390/plants13172469
- Helguera M., Vanzetti L., Soria M., Khan I.A., Kolmer J., Dubcovsky J. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci*. 2005;45:728-734. doi 10.2135/cropsci2005.0728
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology*. 1926;16:89-120
- McIntosh R.A., Brown G.N. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Ann Rev Phytopatol*. 1997;35:311-326. doi 10.1146/annurev.phyto.35.1.311
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(19):4321-4325. doi 10.1093/nar/8.19.4321
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can J Res*. 1948;26(5):496-500. doi 10.1139/cjr48c-033
- Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilisation of *Aegilops* (goat-grass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*. 2008;163:1-19. doi 10.1007/s10681-007-9624-y
- Sears E.R. Chromosome engineering in wheat. In: Stadler Genetical Symposium. New York; London, 1972;4:23-38
- Sibikeev S.N., Gulyaeva E.I., Druzhin A.E., Andreeva L.V. The effect of the 7DL-7Ae#1L·7Ae#1S translocation on the productivity and quality of spring bread wheat grain. *Vavilov J Genet Breed*. 2022;26(6):537-543. doi 10.18699/VJGB-22-65

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.02.2026. После доработки 07.05.2026. Принята к публикации 08.05.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-88

## Способность FGF21 снижать выраженность признаков неалкогольной жировой болезни печени у мышей зависит от пола и диеты

Н.Ю. Балыбина , Е.Н. Макарова , Т.В. Яковлева , А.Ю. Казанцева , Н.М. Бажан 

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

 n.yu.balybina@gmail.com

**Аннотация.** Потребление высококалорийной пищи вызывает развитие ожирения и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Патогенез НАЖБП зависит от состава диеты. Введение фактора роста фибробластов 21 (FGF21) ожиревшим мышам улучшает метаболизм и состояние печени, однако зависимость этого эффекта от пола и состава диеты еще не изучена. Цель нашего исследования – изучить влияние пола на состояние печени у мышей с алиментарным ожирением, вызванным диетами разного состава, и на способность FGF21 благотворно влиять на метаболическую функцию печени. Ожирение индуцировали у самцов и самок мышей C57BL/6J высокожирной диетой (ВЖД) или диетой кафетерия (ДК). После развития ожирения мышам вводили FGF21 (1 мг/кг, 7 дней) и оценивали морфофункциональное состояние печени и экспрессию генов, участвующих в процессах метаболизма жиров и углеводов, воспаления, фиброза и апоптоза в ткани печени. При содержании на ВЖД стеатоз печени у самок был менее выражен, чем у самцов. FGF21 не влиял на площадь липидных капель у особей обоих полов, но оказывал зависящее от пола влияние на экспрессию генов: у самок снижал экспрессию генов гликолиза и липогенеза, препятствуя отложению липидов, а у самцов – генов воспаления, апоптоза и фиброза, предотвращая переход стеатоза в стеатогепатит (воспаление печени). При содержании на ДК у мышей обоих полов развивался выраженный стеатоз. FGF21 снижал содержание липидов в печени независимо от пола. Однако только у самок FGF21 снижал экспрессию гена *Cidec*, участвующего в образовании липидных капель, и повышал количество апоптотных телец. У самцов эффект FGF21 на накопление липидов в печени, по-видимому, опосредован действием на другие ткани: жировую, мышечную и т.д. Таким образом, у мышей с ожирением половые различия в степени выраженности стеатоза печени зависели от типа диеты и проявлялись только на фоне ВЖД. Введение FGF21 приводило к уменьшению общей площади липидных капель в печени у мышей обоих полов только на фоне выраженного стеатоза, вызванного содержанием на ДК. Влияние FGF21 на экспрессию генов в печени зависело от пола как на фоне высокожирной диеты, так и на фоне диеты кафетерия.

**Ключевые слова:** неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП); стеатоз; FGF21; диета; ожирение; половые различия; печень

**Для цитирования:** Балыбина Н.Ю., Макарова Е.Н., Яковлева Т.В., Казанцева А.Ю., Бажан Н.М. Способность FGF21 снижать выраженность признаков неалкогольной жировой болезни печени у мышей зависит от пола и диеты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):863-874. doi 10.18699/vjgb-26-88

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке РНФ, проект № 23-15-00093.

**Вклад авторов.** Балыбина Наталья Юрьевна – обработка результатов эксперимента, написание статьи; Казанцева Антонина Юрьевна – проведение экспериментов, обработка результатов экспериментов, редактирование статьи; Макарова Елена Николаевна – планирование и проведение экспериментов, редактирование статьи; Яковлева Татьяна Владимировна – обработка результатов, редактирование статьи; Бажан Надежда Михайловна – идея работы, планирование экспериментов, утверждение окончательной версии публикации.

## The ability of FGF21 to ameliorate signs of non-alcoholic fatty liver disease in mice depends on sex and diet

N.Yu. Balybina , E.N. Makarova , T.V. Jakovleva , A.Yu. Kazantseva , N.M. Bazhan 

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

 n.yu.balybina@gmail.com

**Abstract.** Consumption of high-calorie food leads to the development of obesity and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The pathogenesis of NAFLD depends on the composition of the diet. Administration of fibroblast growth factor 21 (FGF21) to obese mice improves metabolism and liver condition; however, the dependence of this effect on sex and diet composition has not been studied. Objective: To investigate the influence of sex on liver condition in mice with diet-induced obesity caused by different diets and on the ability of FGF21 to beneficially affect liver function. Obesity was induced in male and female C57BL/6J mice using a high-fat diet (HFD) or a cafeteria diet (DCaf). After obesity development, mice were administered FGF21 (1 mg/kg for 7 days), and the morphofunctional state and gene expression

in the liver were assessed. When maintained on an HFD, hepatic steatosis was less severe in females than in males. FGF21 did not affect the lipid droplet area in individuals of either sex but exerted a sex-dependent influence on gene expression: in females, it reduced the expression of glycolysis and lipogenesis genes, preventing lipid accumulation, while in males, it reduced the expression of inflammation, apoptosis, and fibrosis genes, preventing the transition from steatosis to steatohepatitis. When maintained on a DCaf, pronounced steatosis developed in mice of both sexes. FGF21 reduced liver lipid content regardless of sex. However, only in females did FGF21 reduce the expression of the *Cidec* gene involved in lipid droplet formation and increase the number of apoptotic bodies. In males, the effect of FGF21 on lipid accumulation in the liver appeared to be mediated by its action on other tissues. Thus, in obese mice, sex differences in the severity of hepatic steatosis depended on the diet type and were observed only against the background of HFD. Administration of FGF21 led to a reduction in the total area of lipid droplets in the liver in mice of both sexes only against the background of pronounced steatosis induced by the DCaf. The influence of FGF21 on gene expression in the liver was sex-dependent, both against the background of HFD and DCaf.

**Key words:** non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); steatosis; FGF21; diet; obesity; sex differences; liver

**For citation:** Balybina N.Yu., Makarova E.N., Jakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Bazhan N.M. The ability of FGF21 to ameliorate signs of non-alcoholic fatty liver disease in mice depends on sex and diet. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):863-874. doi 10.18699/vjgb-26-88

## Введение

Ожирение – заболевание, которое влечет за собой развитие ряда метаболических нарушений, в частности неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Это заболевание характеризуется избыточным накоплением липидов в печени и имеет прогрессирующее течение от стеатоза печени (отложения липидов в гепатоцитах) до неалкогольного стеатогепатита (воспаления печени), фиброза и цирроза (Friedman et al., 2018; Haas et al., 2019). Поиск эффективного лечения НАЖБП требует адекватных лабораторных моделей, воспроизводящих нарушения, возникающие у человека.

Одной из наиболее распространенных моделей ожирения и сопутствующих заболеваний на мышах является ожирение, индуцированное высокожирной диетой (ВЖД) (Speakman, 2019). При таком типе диеты животные получают от 40 до 65 % ккал из жира (Speakman, 2019). Эта диета способствует развитию выраженного ожирения и связанных с ним нарушений и наиболее часто используется в исследованиях неалкогольной жировой болезни печени (Hu et al., 2018). Однако в популяции человека основной причиной ожирения чаще служит потребление комбинации жиров и углеводов. Соответствующая модель у лабораторных животных известна как «диета кафетерия» (ДК) (Buyukdere et al., 2019). При этом подходе животным предоставляется свободный выбор между высокожирной: сало, чипсы, колбаса и т. п. – и высокоуглеводной пищей: печенье, бисквиты, сладкие напитки. Предполагается, что механизмы развития ожирения и сопутствующих нарушений у животных точнее воспроизводятся на рационе близком к типу питания человека.

Пол оказывает влияние на развитие ожирения. Показано, что при содержании мышей на ВЖД у самок обычно ниже масса тела и печени, а также содержание триглицеридов в печени, чем у самцов (Senthil et al., 2014; Makarova et al., 2021b). А экспрессия гена инсулинового рецептора (*InsR*) и генов, участвующих в метаболизме липидов (*Ppara*, *Pgc1a*, *Fgf21*, *Acca*, *Acdb*, *Fasn*), выше у самок по сравнению с самцами (Makarova et al., 2021b). Однако неизвестно, наблюдаются ли при этом половые различия в степени развития неалкогольной жировой болезни печени. В настоящей работе впервые комплексно исследованы

гены воспаления, фиброза и апоптоза, экспрессия которых изменяется при развитии неалкогольной жировой болезни печени. При содержании мышей на ДК самки имеют более выраженные признаки нарушения морфологии и функции печени, включая большее накопление липидных капель и триглицеридов, и более высокий уровень экспрессии генов провоспалительных факторов, чем самцы (Gasparin et al., 2018). Исходя из этого, терапевтические подходы к лечению НАЖБП могут зависеть от пола и типа диеты.

Одним из перспективных кандидатов для лечения НАЖБП считается фактор роста фибробластов 21 (Fibroblast growth factor 21, FGF21) – член семейства факторов роста фибробластов с широким спектром метаболических функций (Li H. et al., 2013). Введение экзогенного FGF21 ослабляет проявления стеатоза печени (Leow et al., 2023), способствует снижению ожирения, инсулинорезистентности и содержания свободных жирных кислот в крови как у грызунов, так и у приматов (Fisher, Maratos-Flier, 2016; Makarova et al., 2021b; Bazhan et al., 2023). Эти данные стимулировали изучение FGF21 в качестве средства терапии НАЖБП и других метаболических нарушений.

Показано, что у мышей экспрессия эндогенного FGF21 и эффекты рекомбинантного FGF21 на углеводно-жировой обмен зависят от пола животного и этиологии ожирения (Makarova et al., 2020, 2021a; Bazhan et al., 2023). На фоне ВЖД FGF21 улучшает общие метаболические показатели у обоих полов (Makarova et al., 2021b) и снижает признаки НАЖБП у самцов (Keinicke et al., 2020), тогда как у самок, содержащихся на ВЖД, влияние FGF21 на признаки НАЖБП не изучено. При содержании животных на ДК FGF21 снижает уровни жирных кислот и лептина в крови, повышает толерантность к глюкозе и экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию жирового обмена в печени, только у самцов мышей (Bazhan et al., 2023). Можно предположить, что при содержании на ДК существует половой диморфизм эффектов FGF21 на признаки неалкогольной жировой болезни печени. Исследование этого вопроса пока не проводилось. Цель нашей работы – изучение влияния пола на состояние печени у мышей с алиментарным ожирением, вызванным диетами разного состава, и на способность FGF21 благотворно влиять на метаболическую функцию печени.

## Материалы и методы

**Животные.** Данная работа продолжает эксперименты по оценке влияния экзогенного FGF21 на выбор пищи и метаболические показатели у мышей разного пола с ожирением, индуцированным диетами разного состава. Схема эксперимента и состав диет подробно описаны ранее (Makarova et al., 2021b; Bazhan et al., 2023). Было проведено два эксперимента, в которых использованы самцы и самки мышей линии C57BL/6J из вивариев Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Эксперимент по влиянию введения FGF21 на метаболические признаки у мышей с ожирением, вызванным содержанием на высокожирной диете (ВЖД), проводили в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН. Для индукции ожирения мышам (17 самцов и 20 самок) в возрасте 12 недель к стандартному корму (Ssniff Spezialdiäten GmbH, белки 19 %, жиры 3.3 %) добавляли гранулы высокожирного корма, в котором 60 % ккал приходится на жир (D12492, Ssniff Spezialdiäten GmbH, белки 24.4 %, жиры 34.6 %), и в дальнейшем животных содержали на смеси этих кормов, 80–90 % энергии мыши потребляли с ВЖД (Makarova et al., 2021b). В этом эксперименте самки набирали вес менее интенсивно, чем самцы. Введение FGF21 начинали, когда масса тела самцов составляла 44–46 г, а у самок превышала 30 г. Возраст мышей к началу введения FGF21 варьировал от 28 до 38 недель.

Эксперимент по влиянию введения FGF21 на метаболические признаки у мышей с ожирением, вызванным содержанием на диете кафетерия (ДК), проводили в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Bazhan et al., 2023). Для индукции ожирения мышам в возрасте 10 недель к стандартному корму (Assortiment Agro, Тураково, Московская область, Россия) добавляли свиное сало и сладкое сдобное печенье. Ранее мы показали, что на такой диете темпы набора веса у самок и самцов не различаются (Bazhan et al., 2023). Введение FGF21 начинали в возрасте 28 недель, когда средний вес самцов мышей был 42.13 г (36.1–47.5 г), средний вес самок 41.6 г (37.3–44.2 г).

В каждом эксперименте животные были разделены на четыре группы: самцы, которым вводили растворитель – фосфатно-солевой буфер (ФСБ); самцы, получавшие FGF21; самки, которым вводили ФСБ; и самки, получавшие FGF21. В каждой группе было по 5–7 особей.

В течение семи дней мышам подкожно вводили рекомбинантный мышинный белок FGF21 в дозе 1 мг/кг веса тела или эквивалентное количество ФСБ. Доза была выбрана в соответствии с результатами J. Xu с коллегами, которые вводили FGF21 в дозе 0.1, 1 и 10 мг/кг и показали, что фармакологический эффект FGF21 начинает проявляться с дозы 1 мг/кг веса тела (Xu et al., 2009). По окончании эксперимента, через сутки после последнего введения, животных декапитировали. Печень выделяли и взвешивали. Относительную массу печени определяли к тощей массе животного (масса тела за вычетом массы жира). Для дальнейшего изучения экспрессии генов образцы печени замораживали в жидком азоте. Образцы печени для гистологического анализа помещали в 10 % раствор формалина.

**Получение и очистка мышинного рекомбинантного белка FGF21.** Получение и очистку мышинного рекомбинантного FGF21 мыши проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Makarova et al., 2021b).

**Определение уровня триглицеридов в печени.** Для определения уровня триглицеридов образцы печени помещали в ФСБ в соотношении 8 мл ФСБ на 1 мг образца. Далее образец гомогенизировали и центрифугировали на низкой скорости (~50 g). После отбирали супернатант и центрифугировали повторно на той же скорости. После повторного центрифугирования супернатант отбирали для определения содержания триглицеридов. Концентрацию триглицеридов измеряли с помощью энзиматического колориметрического метода набором для определения концентрации триглицеридов «Триглицериды-Ново жидкая форма» фирмы Вектор-Бест (Новосибирск, Россия) (кат. № В-8323).

**Анализ гистологической структуры печени.** Для оценки степени развития стеатоза: накопления липидов в печени, содержания макрофагов и апоптозных телец печени – использовали общепринятый диагностический подход (Янко и др., 2021; Leow et al., 2023), препараты печени окрашивали гематоксилином и эозином по стандартному протоколу (Makarova et al., 2021a). F.R.S. Gasparin с коллегами показали, что неокрашиваемые округлые включения, обнаруженные с помощью окраски гематоксилином и эозином, являются липидными включениями и их количество коррелирует с количеством липидов, определенных с помощью окраски Sudan III (Gasparin et al., 2018).

Для исследования гистологической структуры печени использовали световой микроскоп фирмы Zeiss (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Йена, Германия) со встроенной камерой. Для каждого животного делали по 10 фотографий срезов печени на увеличении  $\times 400$ . Статистическую обработку проводили по усредненным данным для каждого животного ( $n = 5-7$ ). Подсчет площади липидных капель, количества макрофагов и апоптозных телец производили с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, США). Выделяли липидные капли различного размера. Крупными считали липидные капли, смещавшие ядро к периферии клетки; средними – плотно прилегающие липидные включения, которые не смещали ядро; и мелкими – липидные капли, расположенные на расстоянии друг от друга. Рассчитывали площадь, занимаемую липидами в целом (сумма площадей липидных капель различного размера) и липидными каплями различного размера от общей площади фотографии (Makarova et al., 2021a).

**Оценка уровня мРНК генов.** Уровень мРНК генов, участвующих в процессах метаболизма жиров и углеводов, воспаления, фиброза, апоптоза, изучали методом относительной оценки с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (Relative quantitation real-time PCR). Из образцов тканей 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, Москва, Россия) и олиго-dT праймера по протоколу производителя. ПЦР проводили согласно инструкции с использованием готовой реакционной смеси qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Москва, Россия) и реагентов фирмы Applied Biosystems: TaqMan Gene Expression Assay для генов мыши Beta-actin, *Actb*, Mm00607939\_s1C. Исследовали экспрессию генов, вовлеченных в различные процессы и системы печени: гликолиз (Glucokinase, *Gck*, Mm00439129\_m1; Pyruvate kinase liver and red blood cell, *Pklr*, Mm00443090\_m1); глюконеогенез (Glucose-6-phosphatase, *G6p*, Mm00839363\_m1; Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, *Pck1*, Mm01247058\_m1); система FGF21 (Fibroblast growth factor 21, *Fgf21*, Mm00840165\_g1; Klotho beta, *Klb*, Mm00473122\_m); окисление липидов (Peroxisome proliferator activated receptor alpha, *Ppara*, Mm0040939\_m1; Carnitine palmitoyltransferase 1a, *CPT1a*, Mm01231183\_m1; Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha, *Ppargc1a*, Mm01208835\_m1); синтез липидов (Fatty acid synthase, *Fasn*, Mm00662319\_m1; Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha, *Acca*, Mm01304285\_m1; Acetyl-coenzyme A carboxylase beta, *Accb*, Mm01204683\_m1; Cell death-inducing DFFA-like effector c, *Cidec*, Mm00617672\_m1); воспаление и фиброз (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1, *Timp1*, Mm01341361\_m1; Transforming growth factor, beta 1, *Tgfb1*, Mm01178820\_m1; CD68 antigen, *Cd68*, Mm03047343\_m1; Tumor necrosis factor alpha, *Tnfa*, Mm00443258\_m1; Interleukin 1 beta, *Il1b*, Mm00434228\_m1; Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2, *Nfe2l2*, Mm00477784\_m1; Chemokine (C-C motif) ligand 3, *Ccl3*, Mm00441259\_g1); апоптоз (BCL2, apoptosis regulator, *Bcl2*, Hs04986394\_s1; BCL2-antagonist/killer 1, *Bak1*, Mm00432045\_m1); фактор роста (Insulin-like growth factor 1, *Igf1*, Mm00439560\_m1). В качестве эндогенного контроля использовали бета-актин. Полимеразную цепную реакцию и флуоресцентную детекцию проводили на ПЦР-системе Applied Biosystems VIIA 7 в режиме реального времени. Относительное ко-

личественное определение проводили с помощью метода сравнительного порогового цикла (CT) ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

**Статистический анализ.** Для анализа влияния FGF21 на накопление липидов в печени использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с факторами «Пол» и «ЭГ» (экспериментальная группа). Для множественных сравнений использовали *post-hoc* Newman–Keuls test. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

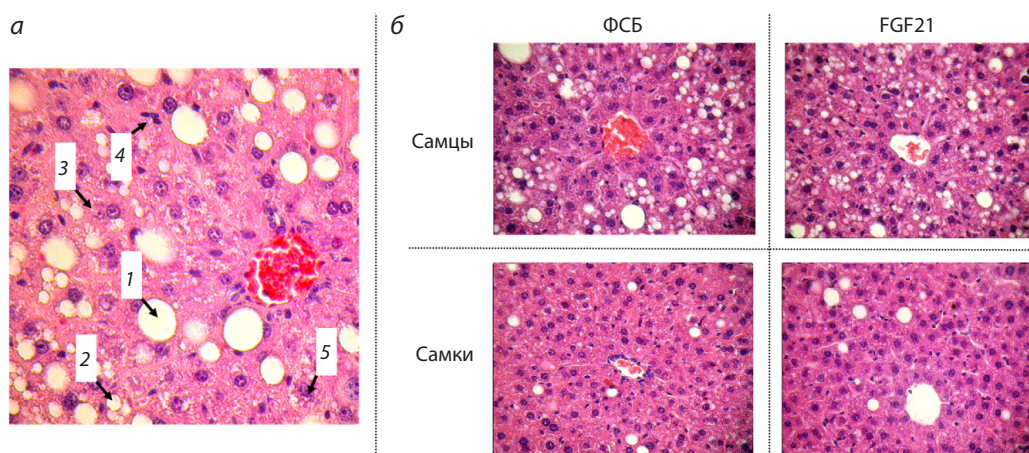
В связи с неоднородностью дисперсий данные по экспрессии генов анализировали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U test),  $n = 5-7$ . Значимость определялась как  $p < 0.05$ . Данные по экспрессии генов представлены в виде медианных, средних, максимальных и минимальных значений, а также 25–75 % разброса значений для каждого показателя.

Все анализы проводили с использованием программного пакета STATISTICA 6 (StatSoft, TIBCO Software Inc., Пало-Альто, Калифорния, США).

## Результаты

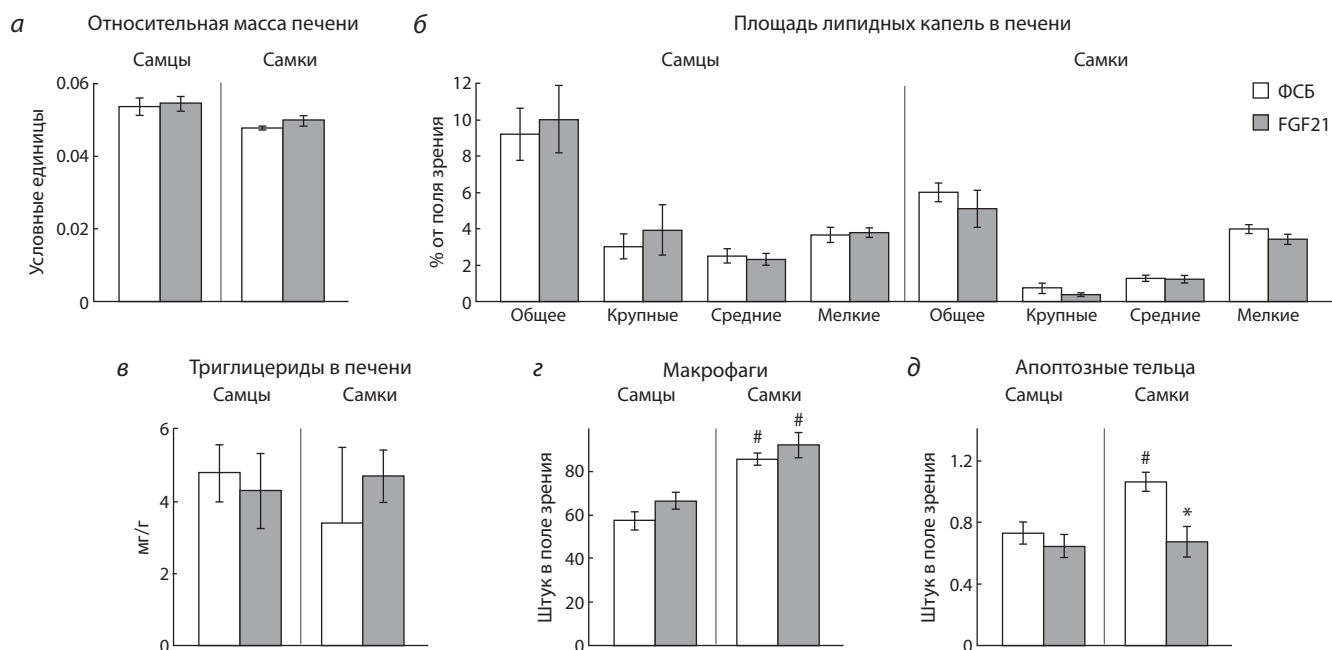
**Эксперимент «Высокожирная диета».** Структура печени. На рис. 1, а представлена типичная гистологическая картина печени при ожирении: с гепатоцитами, содержащими большие, средние и малые жировые капли, а также с макрофагами и апоптозными тельцами.

При содержании животных на высокожирной диете (ВЖД) у самок в печени признаки стеатоза были менее выражены, чем у самцов (см. рис. 1, б). Относительная масса печени у самок была ниже, чем у самцов (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,20)} = 7.52, p < 0.05$ ) (рис. 2, а). Площадь мелких липидных капель и содержание триглицеридов в печени у самок и самцов, получавших ФСБ, не различались, тогда как общая площадь липидных капель (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,20)} = 7.45, p < 0.05$ ) и капель среднего (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,20)} = 12.39, p < 0.01$ ) и крупного размеров (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,20)} = 9.93, p < 0.01$ )



**Рис. 1.** Репрезентативный рисунок: а – накопление липидов в печени у самцов и самок мышей, содержащихся на высокожирной диете, получавших ФСБ или FGF21; б – общий план строения печени мышей при ожирении.

Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ . Липидные капли: крупные (1), средние (2) и мелкие (3); 4 – макрофаги; 5 – апоптозные тельца.



**Рис. 2.** Относительная масса печени (а), площадь липидных капель (б), содержание ТГ (в), количество макрофагов (г) и апоптотических телец (д) в печени самцов и самок мышей, содержащихся на высокожирной диете, получавших ФСБ или FGF21.

#  $p < 0.05$ , сравнение с самцами, *post-hoc* Newman–Keuls test; \*  $p < 0.05$ , сравнение с ФСБ, *post-hoc* Newman–Keuls test.

была достоверно ниже у самок, чем у самцов (см. рис. 2, б, в, д). Однако количество макрофагов (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,20)} = 39.07$ ,  $p < 0.001$ ; *post-hoc* Newman–Keuls test,  $p < 0.05$ ) и апоптотических телец (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,20)} = 5.02$ ,  $p < 0.05$ ; *post-hoc* Newman–Keuls test,  $p < 0.05$ ) у самок превышало данный показатель у самцов, что свидетельствует о более выраженном воспалении у самок, чем у самцов (см. рис. 2, г).

Введение FGF21 не влияло на относительную массу печени, содержание триглицеридов, макрофагов и площадь липидных капель в печени, но снижало количество апоптотических телец (влияние фактора «ЭГ»,  $F_{(1,20)} = 8.67$ ,  $p < 0.01$ ; *post-hoc* Newman–Keuls test,  $p < 0.05$  для самок) в печени мышей обоих полов (см. рис. 2, г, д).

#### Экспрессия генов, участвующих в процессах метаболизма липидов и углеводов

При содержании на ВЖД у самок, получавших ФСБ, уровень экспрессии генов *Fgf21* ( $p < 0.01$ ,  $U = 0.00$ ,  $n(\text{♀}) = 5$ ,  $N(\text{♂}) = 7$ ), *Acca* ( $p < 0.01$ ,  $U = 0.00$ ,  $n(\text{♀}) = 5$ ,  $N(\text{♂}) = 7$ ) и *Ppara* ( $p < 0.05$ ,  $U = 4.00$ ,  $n(\text{♀}) = 5$ ,  $N(\text{♂}) = 7$ ) был выше по сравнению с самцами. Введение FGF21 снижало экспрессию генов *Gck* ( $p < 0.05$ ,  $U = 3.00$ ,  $n = 5$  для обеих групп), *Pklr* ( $p < 0.05$ ,  $U = 2.00$ ,  $n = 5$  для обеих групп) и *Fasn* ( $p < 0.05$ ,  $U = 2.00$ ,  $n = 5$  для обеих групп) у самок и не влияло на экспрессию изученных генов у самцов (рис. 3).

#### Экспрессия генов, участвующих в процессах воспаления, фиброза и апоптоза

При введении ФСБ уровень экспрессии генов *Tnfa* ( $p < 0.05$ ,  $U = 5.00$ ,  $n(\text{♀}) = 5$ ,  $N(\text{♂}) = 7$ ) и *Nfe2l2* ( $p < 0.05$ ,  $U = 2.00$ ,  $n(\text{♀}) = 5$ ,  $N(\text{♂}) = 7$ ) у самок был выше, чем у самцов. Вве-

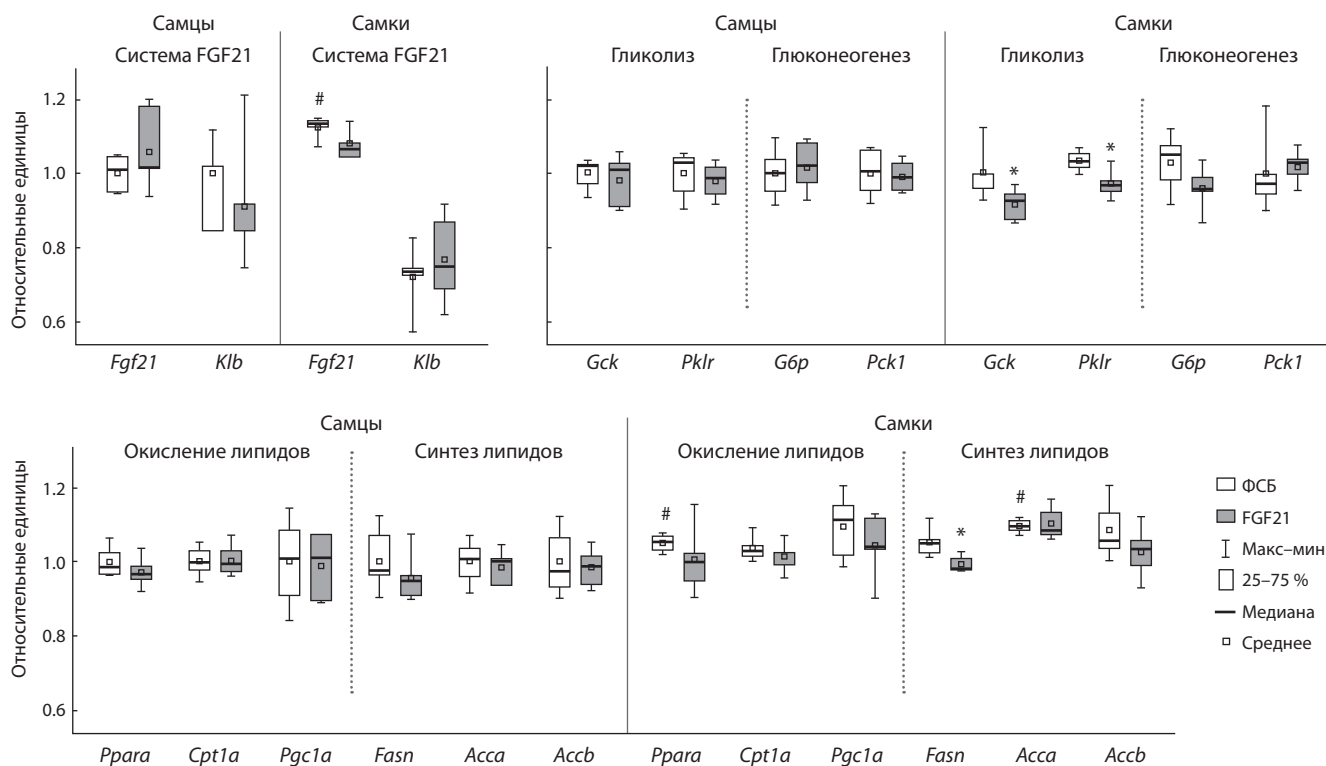
дение FGF21 снижало экспрессию генов *Tgf1b* ( $p < 0.05$ ,  $U = 6.50$ ,  $n = 7$  для обеих групп), *Nfe2l2* ( $p < 0.05$ ,  $U = 9.00$ ,  $n = 7$  для обеих групп), *Bak1* ( $p < 0.05$ ,  $U = 2.00$ ,  $n = 7$  для обеих групп), *Igf1* ( $p < 0.05$ ,  $U = 5.00$ ,  $n = 7$  для обеих групп) у самцов и не влияло на экспрессию изученных генов у самок (рис. 4).

**Эксперимент «Диета кафетерия». Структура печени.** При содержании животных на диете кафетерия (ДК) мыши обоих полов в контроле демонстрировали высокое содержание липидов в печени, половых различий по этому показателю не обнаружено (рис. 5 и 6, б). Относительная масса печени и содержание триглицеридов в печени не различались у самцов и самок мышей (см. рис. 6, а, в). У самок отмечено повышенное количество макрофагов по сравнению с самцами (влияние фактора «Пол»,  $F_{(1,14)} = 4.56$ ,  $p < 0.05$ ) (см. рис. 6, г). Количество апоптотических телец в контроле у самок и самцов не различалось (см. рис. 6, д).

Введение FGF21 снижало относительную массу печени (влияние фактора «ЭГ»,  $F_{(1,14)} = 4.94$ ,  $p < 0.05$ ) и общую площадь липидных капель как у самцов, так и у самок (влияние фактора «ЭГ»,  $F_{(1,14)} = 4.68$ ,  $p < 0.05$ ) (см. рис. 6, а, б). Введение FGF21 не влияло на содержание триглицеридов, количество макрофагов и апоптотических телец печени особей обоих полов (см. рис. 6, в, г, д).

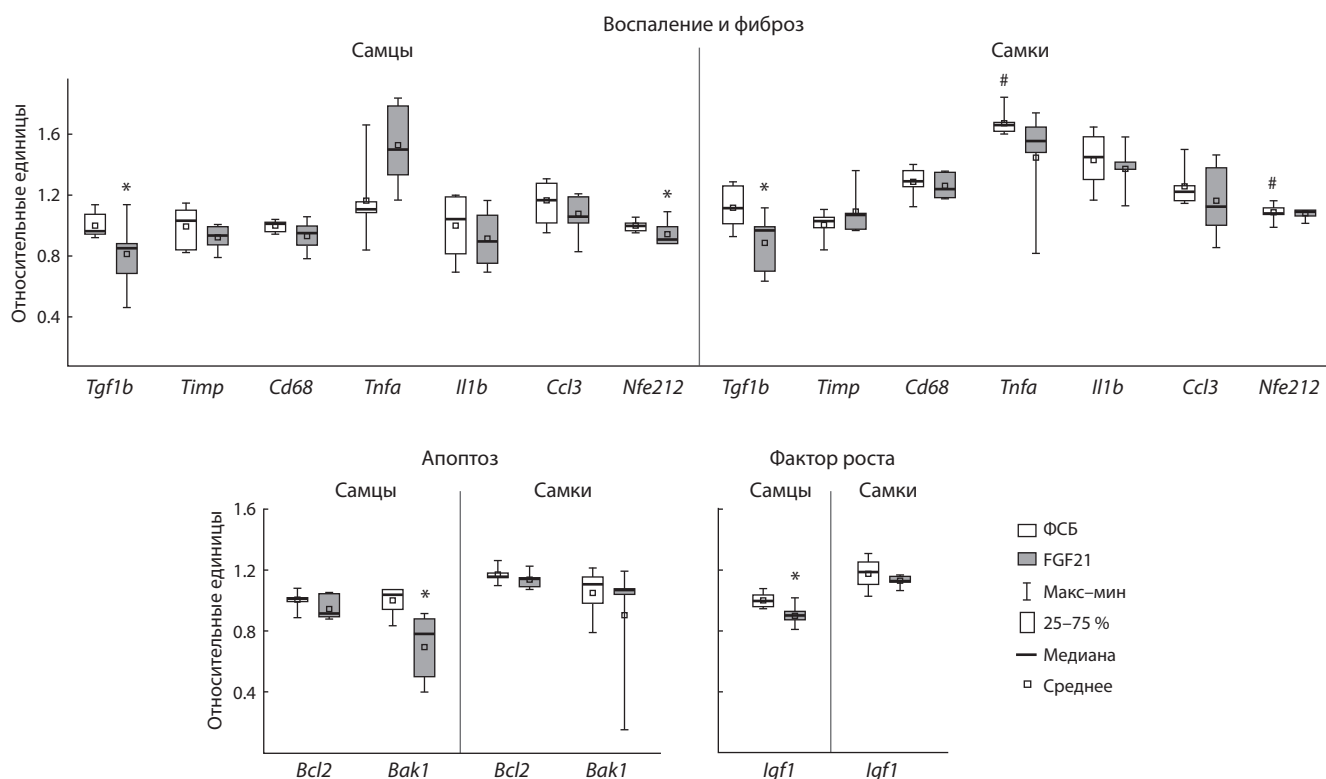
#### Экспрессия генов, участвующих в процессах метаболизма жиров и углеводов

При ожирении, вызванном содержанием животных на диете кафетерия, только экспрессия *Cidec* была ниже у самок ( $p < 0.05$ ,  $U = 3.00$ ,  $n = 5$  для обеих групп), чем у самцов, и FGF21 снижал ее только у особей женского пола



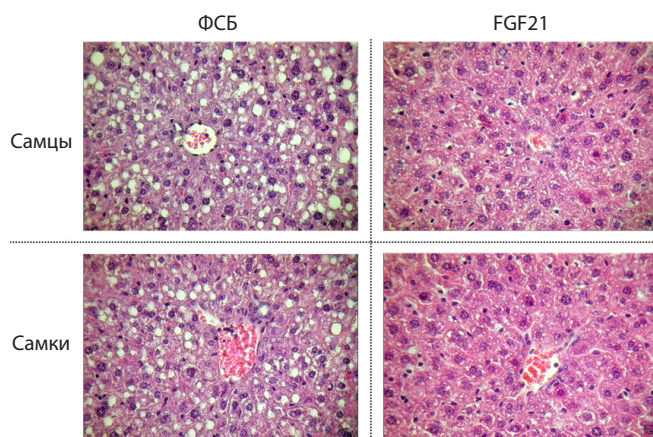
**Рис. 3.** Относительный уровень экспрессии генов метаболизма углеводов и липидов в печени у самцов и самок мышей, содержащихся на высокожирной диете, получавших ФСБ или FGF21.

#  $p < 0.05$ , сравнение с самцами, U тест Манна–Уитни; \*  $p < 0.05$ , сравнение с ФСБ, U тест Манна–Уитни.



**Рис. 4.** Относительный уровень экспрессии генов воспаления, фиброза, апоптоза и инсулиноподобного фактора роста в печени у самцов и самок мышей, содержащихся на высокожирной диете, получавших ФСБ или FGF21.

#  $p < 0.05$ , сравнение с самцами, U тест Манна–Уитни; \*  $p < 0.05$ , сравнение с ФСБ, U тест Манна–Уитни.



**Рис. 5.** Репрезентативный рисунок: накопление липидов в печени у самцов и самок мышей, содержащихся на диете кафетерия, получавших ФСБ или FGF21.

Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ .

( $p < 0.01$ ,  $U = 0.00$ ,  $n = 5$  для обеих групп) (рис. 7). Влияния пола и FGF21 на экспрессию других исследованных генов участников регуляции метаболизма жиров и углеводов не обнаружено.

#### Экспрессия генов, участвующих в процессах воспаления, фиброза и апоптоза

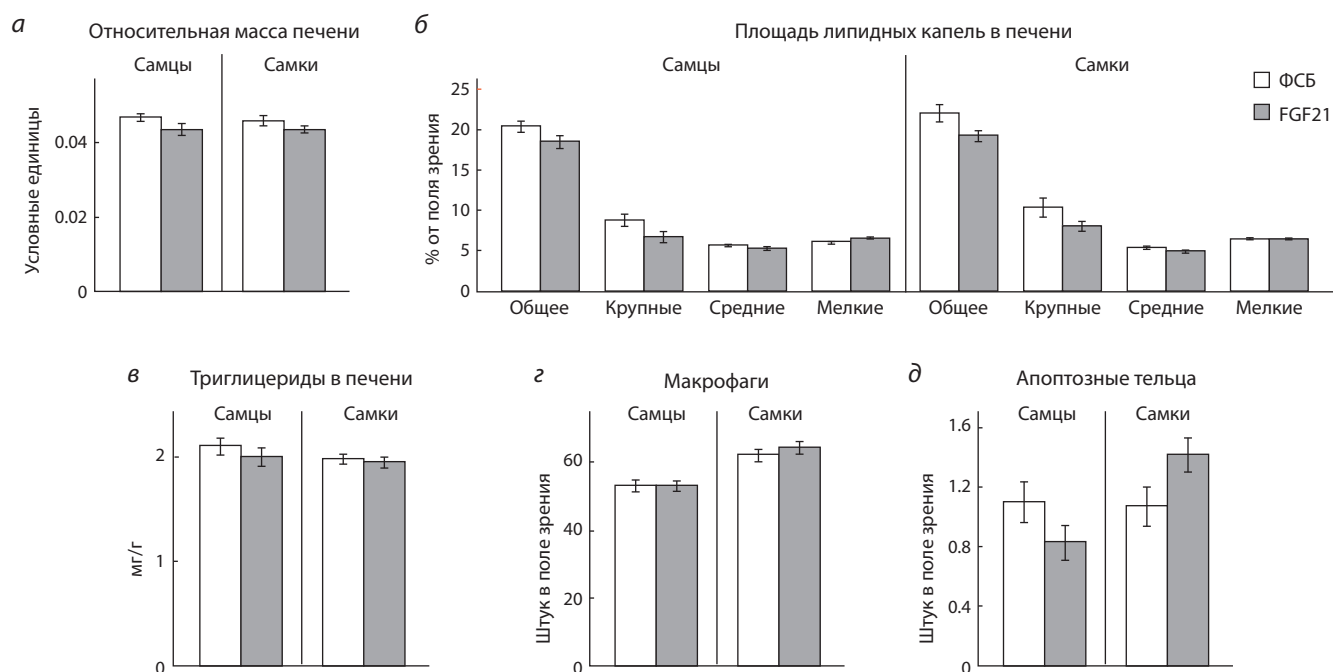
Половых различий в уровне экспрессии генов воспаления и фиброза в печени при ожирении, индуцированном ДК, и влияния введения FGF21 на экспрессию этих генов не выявлено (рис. 8).

## Обсуждение

В работе исследовали половые особенности формирования стеатоза при алиментарном ожирении, вызванном потреблением пищи разного состава, а также влияние FGF21 на морфофункциональное состояние печени и экспрессию генов, участвующих в углеводно-жировом обмене, воспалении, фиброзе, апоптозе, в печени у самцов и самок мышей при различных типах ожирения.

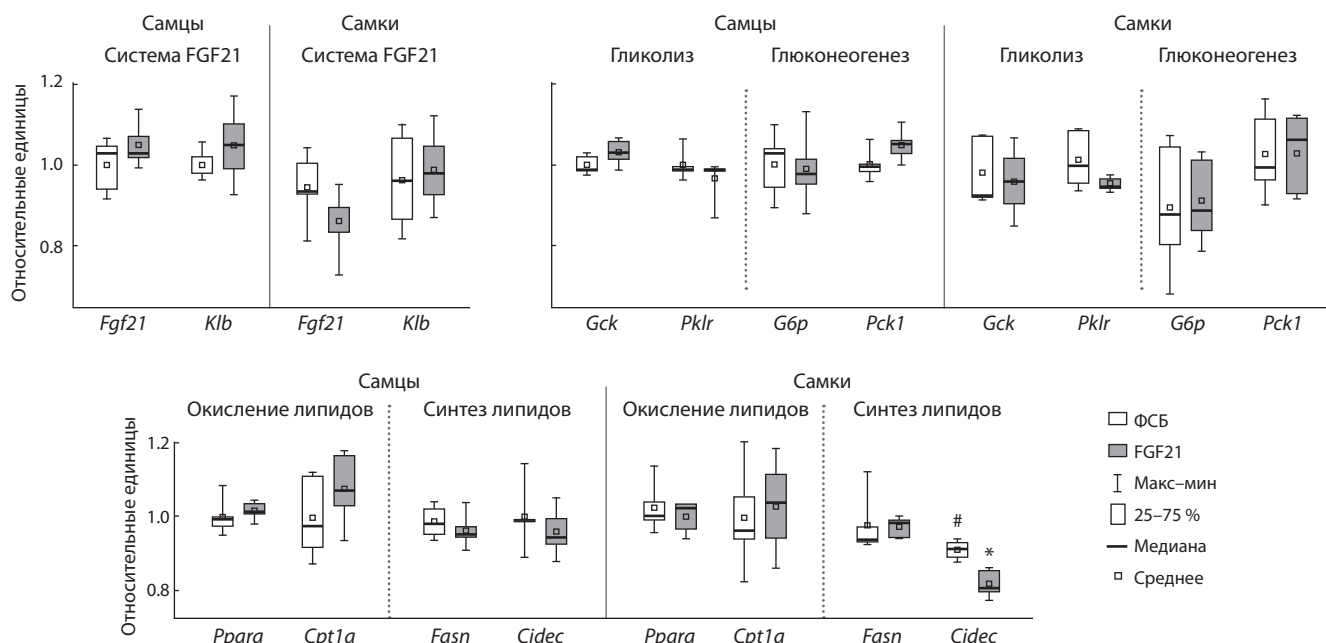
Диета с повышенным содержанием жиров (ВЖД) широко используется при исследовании механизмов развития ожирения и потенциальных средств коррекции связанных с ним нарушений (Li J. et al., 2020). Ранее показано, что потребление ВЖД способствует развитию ожирения и неалкогольной жировой болезни печени у самцов мышей (Lau et al., 2017). В нашем исследовании применялась смешанная диета: стандартный корм и корм с повышенным содержанием жира, в котором 60 % ккал приходится на жир. Согласно данным S. Ну с коллегами, у самцов мышей такое питание вызывает более выраженные нарушения метаболических параметров, более быстрое развитие ожирения, значительное снижение чувствительности к инсулину и большее отложение жира в печени по сравнению с диетами, в которых 10 и 45 % ккал получаются из жира (Hu et al., 2018).

Потребление ВЖД выявило существенные половые различия в гистологическом строении печени. Относительная масса печени и площадь, занимаемая липидными каплями, у самок были значительно ниже, чем у самцов, что указывает на меньшую выраженность стеатоза (см. рис. 1 и 2). Ранее другими авторами (Hwang et al., 2010) и нами в этом эксперименте (Makarova et al., 2021b) показано, что при потреблении ВЖД самки мышей демонстрируют меньшую



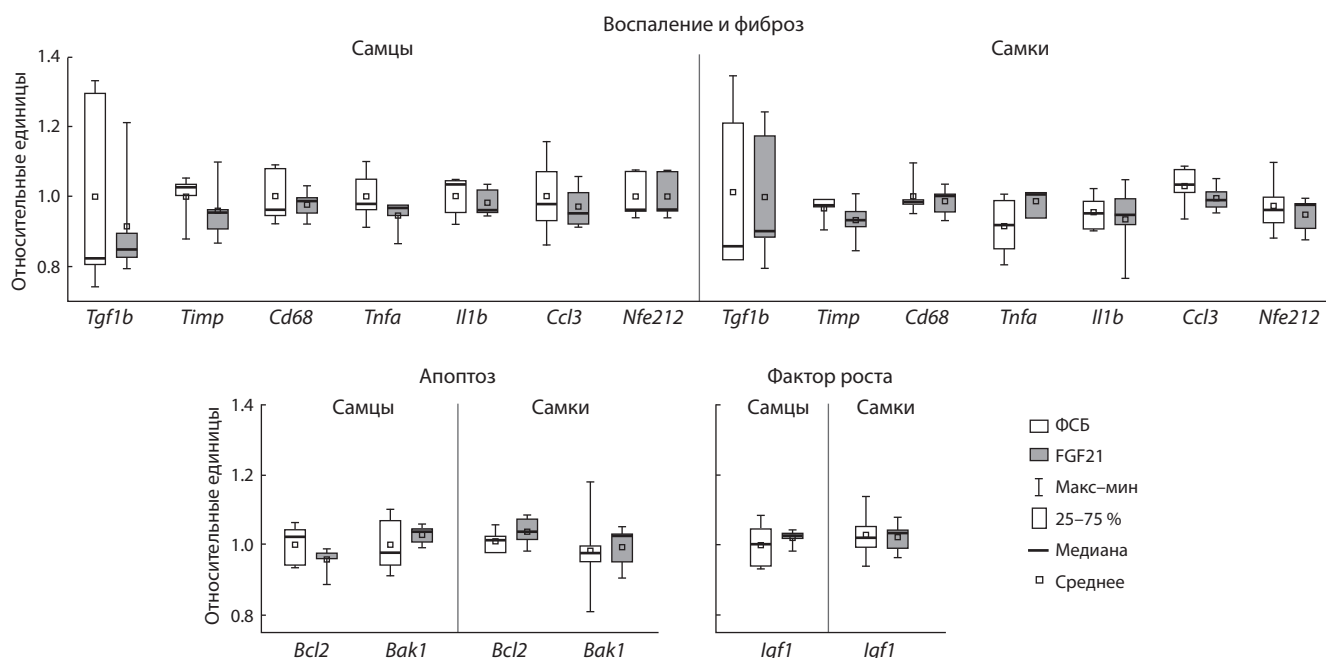
**Рис. 6.** Относительная масса печени (а), площадь липидных капель (б), содержание ТГ (в), количество макрофагов (г) и апоптотических телец (д) в печени самцов и самок мышей, содержащихся на диете кафетерия, получавших ФСБ или FGF21.





**Рис. 7.** Относительный уровень экспрессии генов метаболизма углеводов и липидов в печени у самцов и самок мышей, содержащихся на диете кафетерия, получавших ФСБ или FGF21.

#  $p < 0.05$ , сравнение с самцами, U тест Манна–Уитни; \*  $p < 0.05$ , сравнение с ФСБ, U тест Манна–Уитни.



**Рис. 8.** Относительный уровень экспрессии генов воспаления, фиброза, апоптоза и инсулиноподобного фактора роста в печени у самцов и самок мышей, содержащихся на диете кафетерия, получавших ФСБ или FGF21.

степень ожирения на уровне всего организма, проявляющуюся в меньшей массе тела, количестве жировой ткани и массе печени по сравнению с самцами.

Снижение чувствительности к инсулину способствует отложению липидов в печени и развитию НАЖБП (Takaki et al., 2013). В нашем эксперименте (Makarova et al., 2021b) и другими исследователями (Hwang et al., 2010)

было показано, что самки мышей более чувствительны к инсулину, чем самцы. Вероятно, меньшее накопление липидов в печени у самок может быть следствием их большей чувствительности к инсулину.

Меньшее накопление липидов в печени у самок при содержании на ВЖД можно также объяснить более высокой активностью липидного метаболизма. Уровень экспрессии

генов, кодирующих ферменты липогенеза (*Acca*) и окисления жирных кислот (*Ppara*), был выше у самок (см. рис. 3). У самок также наблюдался повышенный уровень экспрессии гена *Fgf21* в печени. FGF21 способен запускать экспрессию генов, участвующих в окислении свободных жирных кислот, тем самым снижая отложение липидов в печени (Kleiner et al., 2012; Fisher, Maratos-Flier, 2016).

При содержании на ВЖД у самок выявлен более высокий, чем у самцов, уровень экспрессии гена провоспалительного фактора *Tnfa* и сниженный уровень экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего транскрипционный фактор, защищающий клетки от окислительного стресса через активацию генов, участвующих в антиоксидантных и детоксикационных реакциях (см. рис. 4). Показано, что при длительном стрессорном воздействии его уровень может снижаться, усугубляя признаки окислительного стресса (Ye et al., 2023). Эти факты указывают на то, что, несмотря на меньшие жировые отложения в печени, признаки окислительного стресса у самок были более выраженными, чем у самцов.

Мы наблюдали у самок, содержащихся на ВЖД, большее количество макрофагов и апоптозных телец в паренхиме печени по сравнению с самцами как на фоне введения ФСБ, так и FGF21 (см. рис. 2). Сходные изменения наблюдали и при генетическом меланокортиновом ожирении (Makarova et al., 2021a). Макрофаги, в свою очередь, экспрессируют провоспалительные цитокины, такие как *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*, что способствует прогрессированию воспаления и развитию стеатогепатита (Alkhoury et al., 2011).

Таким образом, нами впервые показано, что при потреблении высокожирной пищи самки демонстрируют меньшее накопление липидных капель в печени по сравнению с самцами. Однако у них наблюдаются более высокий уровень экспрессии гена *Tnfa* и большее количество макрофагов и апоптозных телец, что может указывать на большую степень воспаления или быть адаптивной реакцией к потреблению высокожирного корма у самок мышей. Вопрос требует дальнейших исследований.

При введении FGF21 мышам, получавшим ВЖД, только у самок мы наблюдали подавление экспрессии генов гликолиза (*Pklr*, *Gck*) и липогенеза (*Fasn*) (см. рис. 3), что может свидетельствовать о запуске адаптивных механизмов, защищающих печень от избыточного отложения жиров. Несмотря на это, снижения количества липидных капель у самок не обнаружено. Мы связываем это с тем, что, по данным литературы, исходный уровень липидов у самок был лишь слегка повышен по сравнению с нормой (Kim et al., 2013), что ограничивало возможности для видимого улучшения.

У самцов, содержащихся на ВЖД, при более выраженном стеатозе, чем у самок, FGF21 также не влиял на содержание липидов в печени (см. рис. 2). Отсутствие эффекта можно объяснить тем, что FGF21 подавлял экспрессию гена *Igf1* в печени (см. рис. 4) (Borai et al., 2015). Известно, что IGF1 препятствует накоплению жира в печени (Ma, Stanley, 2023). Возможно, выявленное нами и другими исследователями ингибирующее действие

FGF21 на экспрессию *Igf1* может нивелировать прямое, снижающее липиды действие IGF1.

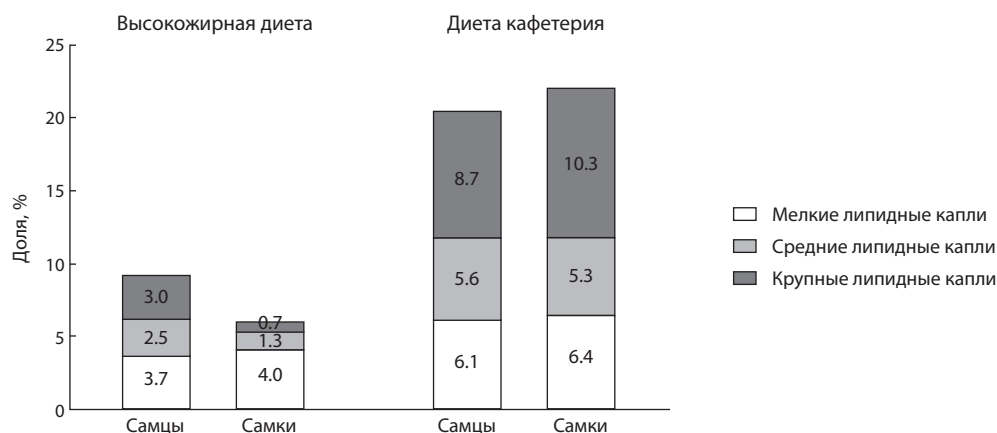
При содержании на ВЖД у особей обоих полов наблюдалось снижение количества апоптозных телец в печени в ответ на введение FGF21 (см. рис. 2), а у самцов также наблюдалось снижение экспрессии проапоптотического гена *Bak1* (см. рис. 5). Так как воспаление часто сопряжено с апоптозом, эти изменения могут указывать на снижение воспаления в печени (Chen et al., 2018). Кроме того, у самцов FGF21 снижал экспрессию профиброгенного гена *Tgfb*, что, возможно, препятствует развитию фиброза – характерного признака прогрессирования неалкогольной жировой болезни печени.

Таким образом, при ожирении, вызванном содержанием на высокожирной диете, эффект FGF21 на состояние печени зависел от степени развития стеатоза: при незначительном количестве липидов, как у самок мышей, эффект направлен на предотвращение отложения жира путем подавления экспрессии генов гликолиза и липогенеза. При выраженных признаках стеатоза, как у самцов в данном исследовании, эффекты FGF21 были направлены на снижение экспрессии генов, вовлеченных в воспалительный процесс.

Ранее нами и другими исследователями показано, что при добавлении в рацион, наряду с избыточным количеством жиров, избыточного количества углеводов самки достигают большей степени ожирения, чем самцы (Gasparin et al., 2018; Bazhan et al., 2020). Однако в нашем исследовании мы обнаружили, что площадь липидных капель в печени у самцов и самок не различалась (см. рис. 6). Отсутствие различий в накоплении липидов в печени при большей степени ожирения самок, наблюдаемого при содержании животных на ДК, может быть связано с относительно низким уровнем экспрессии у них гена *Cidec* по сравнению с самцами (см. рис. 7). Продукт этого гена играет ключевую роль в образовании липидных капель в печени. Показано, что у животных со сниженным уровнем экспрессии *Cidec* наблюдается заметное уменьшение запасов липидов в различных тканях (Chen et al., 2018).

При ожирении, вызванном содержанием животных на ДК, у самок в печени обнаружено больше макрофагов, чем у самцов; это может указывать на то, что у самок ожирение печени отягощено воспалением (см. рис. 6). Ранее F.R.S. Gasparin (Gasparin et al., 2018) и A. Spruss с коллегами (2012) наблюдали более выраженные признаки воспаления печени у самок, чем у самцов. Таким образом, при содержании животных на диете кафетерия не обнаружено различий в степени развития стеатоза печени, однако самки проявляли признаки большего воспаления печени, чем самцы.

Введение FGF21 мышам, содержащимся на ДК, привело к снижению относительной массы печени и содержания липидов в гепатоцитах у представителей обоих полов (рис. 6). Механизм этого эффекта различался: у самок FGF21 подавлял экспрессию гена *Cidec* в печени, продукт которого играет ключевую роль в формировании и слиянии липидных капель (см. рис. 7) (Chen et al., 2018). При



**Рис. 9.** Доля площади (в %) мелких, средних и крупных липидных капель от площади поля зрения, фиксируемой по фото (см. рис. 1 и 5), у самцов и самок мышей при содержании на высокожирной диете и диете кафетерия.

содержании животных на ДК у самцов FGF21 не влиял на экспрессию генов печени, вовлеченных в регуляцию жирового обмена. Можно предположить, что у самцов вызванное FGF21 снижение площади липидов в печени было связано с его действием на белую жировую ткань, которая служит главным органом-мишенью для FGF21 (Makarova et al., 2021b). Ранее мы показали, что у самцов мышей с ожирением, вызванным содержанием на ДК, FGF21 снижает уровни в крови свободных жирных кислот (Bazhan et al., 2023). Это может способствовать снижению захвата жиров в печени и отложению там в виде липидных капель.

Таким образом, FGF21 оказывал схожее воздействие на количество липидов в печени у самцов и самок мышей линии C57BL/6J, находящихся на диете кафетерия. Однако механизмы реализации этого эффекта различны: возможно, у самок он осуществлялся через подавление экспрессии гена липогенеза в печени, а у самцов через внепеченочные механизмы.

Известно, что проявление половых различий во влиянии FGF21 на метаболические параметры зависит от причин развития ожирения. Так, на высокожирной диете FGF21 оказывает однонаправленное влияние у самцов и самок на массу тела и жира, уровень в крови холестерина, глюкозы, инсулина и экспрессию генов гликолиза и синтеза жирных кислот в печени (Makarova et al., 2021b). При содержании животных на диете кафетерия терапевтические эффекты введения FGF21 заметны в большей степени у самцов, выражаясь в снижении уровней жирных кислот и лептина в плазме, улучшении толерантности к глюкозе и повышении регуляции экспрессии генов, участвующих в передаче сигналов инсулина и метаболизме липидов в печени (Bazhan et al., 2023).

В нашем исследовании мы обнаружили, что степень развития стеатоза печени зависит от типа диеты, предлагаемой животным. При этом половые различия в накоплении липидов в печени обнаружены в модели ВЖД, которая характеризовалась ранними стадиями развития стеатоза печени у мышей. При потреблении ВЖД у самок мышей наблюдалось незначительное содержание липидных капель мелкого размера при практическом отсутствии капель

крупного и среднего размеров. Общая площадь липидных капель у самок составляла примерно 6 % от площади поля зрения, что соответствует незначительному превышению нормы для мышей (норма ~5 %) (Leow et al., 2023), в то время как у самцов мышей в печени присутствовали липидные капли всех размеров и общая площадь превышала 9 % от площади поля зрения, что соответствует начальным этапам первой (легкой) стадии развития стеатоза печени у мышей (Leow et al., 2023) (рис. 9).

Потребление ДК вызывало более выраженное накопление липидных капель различного размера в печени у мышей обоих полов, чем потребление ВЖД, при этом половые различия по степени развития стеатоза отсутствовали. И у самцов, и у самок общая площадь липидных капель превышала 20 %, что соответствует более позднему этапу первой стадии стеатоза печени (Leow et al., 2023) (см. рис. 9).

Обнаруженные нами различия в накоплении липидов в печени при различных типах диеты могут быть обусловлены несколькими факторами. Диета кафетерия – не только жиры, но и избыточное количество простых углеводов (сахара), при потреблении которых активируются специфические пути синтеза жиров (*de novo* lipogenesis), которые могут функционировать параллельно с путями усвоения пищевых жиров (Sanders, Griffin, 2016). Это создает дополнительную нагрузку на липидный обмен. Кроме того, избыточное количество углеводов в пище способствует развитию инсулинорезистентности, что, в свою очередь, приводит к накоплению жиров в печени (Takaki et al., 2013). Помимо этого, ДК также может вызывать более выраженное окислительное повреждение клеток печени из-за сочетания различных типов жиров и избытка сахаров, что нарушает процессы утилизации липидов и способствует развитию стеатоза (Asrih, Jornayvaz, 2013).

Влияние FGF21 на печень зависело от степени развития стеатоза. У самок мышей, содержащихся на ВЖД, при отсутствии выраженного стеатоза влияние FGF21 сводилось к предотвращению накопления липидов в печени путем снижения экспрессии генов гликолиза и липогенеза. У самцов мышей на этой же диете, но при ранней

стадии стеатоза, эффект FGF21 заключался в подавлении экспрессии генов воспаления и фиброгенеза. Известно, что уже на ранних этапах развития НАЖБП происходит повышение экспрессии провоспалительных цитокинов, что способствует усугублению течения болезни (Asrih, Jornayvaz, 2013). По-видимому, основное действие FGF21 в этом случае направлено на предотвращение развития неалкогольного стеатогепатита.

При более выраженной стадии развития стеатоза печени, наблюдаемой у самцов и самок, содержащихся на ДК, эффект FGF21 был направлен на снижение площади липидов в печени. Механизм этого воздействия различен у самцов и самок: у самок наблюдалось снижение экспрессии гена *Cidec*, играющего ключевую роль в образовании и слиянии липидных капель (Chen et al., 2018), а у самцов прямого влияния FGF21 на печень не обнаружено.

## Заключение

Настоящее исследование выявило половые различия в развитии неалкогольной жировой болезни печени и ответе на терапию FGF21 в зависимости от типа диеты. При высокожирной диете у самок наблюдался менее выраженный стеатоз, который ассоциировался с более высоким уровнем экспрессии генов метаболизма липидов и более высокой базальной экспрессией *Fgf21*. Однако, судя по экспрессии генов воспаления и количеству макрофагов и апоптотных телец в печени, стеатоз у самок сопровождался усиленным воспалительным ответом, повышающим риск стеатогепатита. В отличие от этого, при диете кафетерия стеатоз был выражен в равной степени у обоих полов, с более выраженными признаками воспаления у самок, по сравнению с самцами.

Эффекты FGF21 зависели от пола и стадии стеатоза: на ранних стадиях стеатоза (высокожирная диета) у самок, судя по экспрессии *Gck* и *Pklr*, он подавлял гликолиз (оба гена относятся к гликолизу) и липогенез (*Fasn*), предотвращая накопление липидов, а у самцов снижал признаки воспаления и оказывал антифиброзное действие. При более выраженной стадии стеатоза (диета кафетерия) FGF21 уменьшал содержание липидов в печени как у самцов, так и у самок мышей, но разными механизмами – у самок через подавление экспрессии гена *Cidec*, у самцов опосредованно, по-видимому, через воздействие на жировую ткань. Таким образом, терапевтическая стратегия применения FGF21 при неалкогольной жировой болезни печени требует учета пола пациента, стадии стеатоза и этиологии ожирения.

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено Независимым этическим комитетом Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 47 от 23 февраля 2019 г. для ВЖД, от 8 ноября 2021 г. для ДК).

## Список литературы / References

Янко Р.В., Чака Е.Г., Зинченко А.С., Сафонов С.Л., Левашов М.И. Особенности моделирования жирового гепатоза у крыс разного возраста на основе высококалорийного рациона. *Ожирение и метаболизм*. 2021;18(4):387-397. doi 10.14341/omet12789

- [Yanko R.V., Chaka E.G., Zinchenko A.S., Safonov S.L., Levashov M.I. Features of modeling fatty liver disease in rats of different ages based on a high-calorie diet. *Obes Metab*. 2021;18(4):387-397. doi 10.14341/omet12789 (in Russia)]
- Alkhoury N., Carter-Kent C., Feldstein A.E. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(2):201-212. doi 10.1586/egh.11.6
- Asrih M., Jornayvaz F.R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J Endocrinol*. 2013;218(3):R25-R36. doi 10.1530/JOE-13-0201
- Bazhan N.M., Iakovleva T.V., Dubinina A.D., Makarova E.N. Impact of sex on the adaptation of adult mice to long consumption of sweet-fat diet. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(8):844-852. doi 10.18699/VJ20.682
- Bazhan N.M., Jakovleva T.V., Kazantseva A.Yu., Kostina N.E., Orlov P.E., Balybina N.Yu., Baranov K.O., Makarova E.N. Studying sex differences in responses to fibroblast growth factor 21 administration in obese mice consuming a sweet-fat diet. *Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(4):333-341. doi 10.18699/VJGB-23-40
- Boparai R.K., Arum O., Miquet J.G., Masternak M.M., Bartke A., Kharedori R.K. Resistance to the beneficial metabolic effects and hepatic antioxidant defense actions of fibroblast growth factor 21 treatment in growth hormone-overexpressing transgenic mice. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:282375. doi 10.1155/2015/282375
- Buyukdere Y., Gulec A., Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*. 2019;7:e6656. doi 10.7717/peerj.6656
- Chen X.L., Han Y.D., Wang H. Relations of hepatic steatosis with liver functions, inflammations, glucolipid metabolism in chronic hepatitis B patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(17):5640-5646. doi 10.26355/eurrev\_201809\_15830
- Fisher F.M., Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:223-241. doi 10.1146/annurev-physiol-021115-105339
- Friedman S.L., Neuschwander-Tetri B.A., Rinella M., Sanyal A.J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908-922. doi 10.1038/s41591-018-0104-9
- Gasparin F.R.S., Carreño F.O., Mewes J.M., Gilglioni E.H., Pagadigorria C.L.S., Natali M.R.M., Utsunomiya K.S., Constantin R.P., Ouchida A.T., Curti C., Gaemers I.C., Elferink R.P.J.O., Constantin J., Ishii-Iwamoto E.L. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(7):2495-2509. doi 10.1016/j.bbdis.2018.04.004
- Haas J.T., Vonghia L., Mogilenko D.A., Verrijken A., Molendi-Coste O., Fleury S., Deprince A., ... Driessen A., Lefebvre P., Staels B., Francque S., Dombrowicz D. Transcriptional network analysis implicates altered hepatic immune function in NASH development and resolution. *Nat Metab*. 2019;1(6):604-614. doi 10.1038/s42255-019-0076-1
- Hu S., Wang L., Yang D., Li L., Togo J., Wu Y., Liu Q., ... Mazidi M., Luo L., Wang S., Douglas A., Speakman J.R. Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. *Cell Metab*. 2018;28(3):415-431.e4. doi 10.1016/j.cmet.2018.06.010
- Hwang L.L., Wang C.H., Li T.L., Chang S.D., Lin L.C., Chen C.P., Chen C.T., Liang K.C., Ho I.K., Yang W.S., Chiou L.C. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity*. 2010;18(3):463-469. doi 10.1038/oby.2009.273
- Keinicke H., Sun G., Mentzel C.M.J., Fredholm M., John L.M., Andersen B., Raun K., Kjaergaard M. FGF21 regulates hepatic metabolic pathways to improve steatosis and inflammation. *Endocr Connect*. 2020;9(8):755-768. doi 10.1530/EC-20-0152
- Kim H.W., Lee J.E., Cha J.J., Hyun Y.Y., Kim J.E., Lee M.H., Song H.K., Nam D.H., Han J.Y., Han S.Y., Han K.H., Kang Y.S.,



- Cha D.R. Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in *db/db* mice. *Endocrinology*. 2013; 154(9):3366-3376. doi 10.1210/en.2012-2276
- Kleiner S., Mepani R.J., Laznik D., Ye L., Jurczak M.J., Jornayvaz F.R., Estall J.L., Chatterjee B.D., Shulman G.I., Spiegelman B.M. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 $\alpha$  in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(24):9635-9640. doi 10.1073/pnas.1207287109
- Lau J.K., Zhang X., Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*. 2017; 241(1):36-44. doi 10.1002/path.4829
- Leow W.Q., Chan A.W.H., Mendoza P.G.L., Lo R., Yap K., Kim H. Non-alcoholic fatty liver disease: the pathologist's perspective. *Clin Mol Hepatol*. 2023;29(Suppl):S302-S318. doi 10.3350/cmh.2022.0329
- Li H., Zhang J., Jia W. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. *Front Med*. 2013;7(1): 25-30. doi 10.1007/s11684-013-0244-8
- Li J., Wu H., Liu Y., Yang L. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp Anim*. 2020;69(3):326-335. doi 10.1538/expanim.19-0148
- Ma I.L., Stanley T.L. Growth hormone and nonalcoholic fatty liver disease. *Immunometabolism* 2023;5(3):e00030. doi 10.1097/IN9.000000000000030
- Makarova E.N., Yakovleva T.V., Balybina N.Yu., Baranov K.O., Denisova E.I., Dubinina A.D., Feofanova N.A., Bazhan N.M. Pharmacological effects of fibroblast growth factor 21 are sex-specific in mice with the *lethal yellow* (*A<sup>y</sup>*) mutation. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(2):200-208. doi 10.18699/VJ20.40-o
- Makarova E., Kazantseva A., Dubinina A., Denisova E., Jakovleva T., Balybina N., Bgatova N., Baranov K., Bazhan N. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) administration sex-specifically affects blood insulin levels and liver steatosis in obese *A<sup>y</sup>* mice. *Cells*. 2021a;10(12): 3440. doi 10.3390/cells10123440
- Makarova E., Kazantseva A., Dubinina A., Jakovleva T., Balybina N., Baranov K., Bazhan N. The same metabolic response to FGF21 administration in male and female obese mice is accompanied by sex-specific changes in adipose tissue gene expression. *Int J Mol Sci*. 2021b;22(19):10561. doi 10.3390/ijms221910561
- Sanders F.W., Griffin J.L. *De novo* lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016;91(2):452-468. doi 10.1111/brv.12178
- Senthil K.S.P., Shen M., Spicer E.G., Goudjo-Ako A.J., Stumph J.D., Zhang J., Shi H. Distinct metabolic effects following short-term exposure of different high-fat diets in male and female mice. *Endocr J*. 2014;61(5):457-470. doi 10.1507/endocrj.EJ13-0455
- Speakman J.R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int J Obes*. 2019;43(8):1491-1492. doi 10.1038/s41366-019-0363-7
- Spruss A., Henkel J., Kanuri G., Blank D., Püschel G.P., Bischoff S.C., Bergheim I. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: Sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol Med*. 2012;18(1):1346-1355. doi 10.2119/molmed.2012.00223
- Takaki A., Kawai D., Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20704-20728. doi 10.3390/ijms141020704
- Xu J., Stanislaus S., Chinookoswong N., Lau Y.Y., Hager T., Patel J., Ge H., ... Hecht R., Li Y.-S., Li Y., Lindberg R., Véniant M.M. Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models – association with liver and adipose tissue effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(5):E1105-E1114. doi 10.1152/ajpendo.00348.2009
- Ye Q., Jiang Y., Wu D., Cai J., Jiang Z., Zhou Z., Liu L., Ling Q., Wang Q., Zhao G. Atractylodin alleviates nonalcoholic fatty liver disease by regulating Nrf2-mediated ferroptosis. *Heliyon*. 2023; 9(7):e18321. doi 10.1016/j.heliyon.2023.e18321

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.11.2025. После доработки 02.04.2026. Принята к публикации 24.04.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-89

## Влияние отбора по поведению на уровень глюкозы в крови у серебристо-черных лисиц после рестрикционного стресса

Р.Г. Гулевич , С.Г. Шихевич , Д.В. Шепелева, А.В. Харламова 

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

 gulevich@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Известно, что отбор серебристо-черных лисиц по отношению к человеку влияет на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую (ГГН) и симпатическую нервную системы, которые, в свою очередь, участвуют в регуляции углеводного обмена при стрессе. Наряду с этим показано влияние генетических факторов на углеводный обмен и толерантность к глюкозе. Оставалось неизвестным, влияет ли отбор по отношению к человеку на уровень глюкозы в крови у серебристо-черных лисиц. В данной работе исследовали базальный уровень глюкозы в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных самцов и самок серебристо-черных лисиц, а также уровень глюкозы после рестрикционного стресса у самок. Полученные результаты свидетельствуют о достоверно более низком базальном уровне глюкозы в крови у ручных лисиц по сравнению с агрессивными и неселекционированными животными, независимо от пола. Кроме того, у неселекционированных самцов этот показатель был ниже по сравнению с агрессивными животными. У агрессивных лисиц найдены половые различия по базальному уровню глюкозы в крови: у самцов этот показатель выше, чем у самок. В течение всего исследуемого периода после стресса (через 10 мин и 2 ч) уровень глюкозы в крови у агрессивных самок оставался повышенным по сравнению с ручными. Спустя 2 ч после стресса только у агрессивных самок отмечали более высокий уровень глюкозы по сравнению с исходным уровнем. В суммарной выборке самок лисиц, независимо от поведения до и после стресса, найдена отрицательная корреляция между уровнем глюкозы в крови и баллом поведения, которым оценивали реакцию на человека. Для сравнения скорости поглощения глюкозы из общего кровотока у самок серебристо-черных лисиц, селекционируемых по поведению, проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ). В целом, судя по показателям площади под кривыми ГТТ, отбор по поведению не влиял на толерантность к глюкозе, вместе с тем у агрессивных самок, в отличие от ручных и неселекционированных, в начале теста отмечали более продолжительный период повышенного уровня глюкозы в крови. Таким образом, отбор по поведению влияет на уровень глюкозы в крови у серебристо-черных лисиц независимо от пола в состоянии покоя, а у самок – и после стресса.

**Ключевые слова:** отбор; поведение; лисицы; агрессивность; стресс; глюкоза; глюкозотолерантность; кортизол; корреляция

**Для цитирования:** Гулевич Р.Г., Шихевич С.Г., Шепелева Д.В., Харламова А.В. Влияние отбора по поведению на уровень глюкозы в крови у серебристо-черных лисиц после рестрикционного стресса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):875-882. doi 10.18699/vjgb-26-89

**Финансирование.** Работа проводилась при поддержке бюджетного проекта FWNR-2026-0032.

**Благодарности.** Выражаем искреннюю благодарность А.С. Бабайловой за помощь в процессе сбора и первичной обработке данных.

**Вклад авторов.** Р.Г. Гулевич – идея работы, планирование экспериментов, редактирование и утверждение окончательной версии публикации; С.Г. Шихевич – обработка и обсуждение результатов, редактирование статьи; Д.В. Шепелева – проведение экспериментов и обсуждение результатов; А.В. Харламова – проведение экспериментов, обсуждение результатов и редактирование статьи.

## Effect of selection for behavior on the blood glucose level in foxes exposed to restriction stress

R.G. Gulevich , S.G. Shikhevich , D.V. Shepeleva, A.V. Kharlamova 

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

 gulevich@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Selection of silver foxes for attitude to humans influences the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system, which, in turn, are involved in the regulation of carbohydrate metabolism under stress. It has also been shown that heredity affects carbohydrate metabolism and glucose tolerance. It remains to find out whether the selection for attitude to humans affected carbohydrate metabolism and blood glucose levels in silver foxes. We studied basal blood glucose levels in tame, aggressive, and unselected male and female silver foxes and glucose levels in females exposed to stress. Our results indicate that the basal blood glucose level in tame foxes is significantly

lower than in unselected or aggressive ones regardless of sex. In unselected males, this parameter was lower than in aggressive animals. Aggressive foxes showed a sex difference in the basal blood glucose level: it was higher in males than in females. The glucose levels in aggressive females remained higher than in tame ones immediately after 10-min stress and two hours afterwards. Only aggressive females showed an excess blood glucose level over the basal one two hours after stress. The bulk group of foxes demonstrated a negative correlation between blood glucose and behavior score (response to humans) both at rest and after stress. A glucose tolerance test (GTT) was performed to compare the rates of glucose absorption from the bloodstream in silver fox females selected for behavior. Although selection for behavior did not affect glucose tolerance, judging from the area under the GTT curves, aggressive females differed from tame and unselected at the beginning of the test in longer persistence of elevated blood glucose. Thus, the selection of silver foxes for attitude to humans influences blood glucose levels at rest in both sexes and after stress in females.

**Key words:** selection; behavior; fox; aggressiveness; stress; glucose; tolerance; cortisol; correlation

**For citation:** Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Shepeleva D.V., Kharlamova A.V. Effect of selection for behavior on the blood glucose level in foxes exposed to restriction stress. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026; 30(6):875-882. doi 10.18699/vjgb-26-89

## Введение

Глюкоза – основной источник энергии для мозга. Повышение уровня глюкозы в крови, обеспечивающее устойчивое поступление в мозг, – важное условие выживаемости во время стресса (Magomedova, Cummins, 2015). Стресс, как известно, активирует симпато-адреналовую и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую системы, сигналы которых причастны к стресс-индуцированной гипергликемии (Stover et al., 2002; Barth et al., 2007; Magomedova, Cummins, 2015; Ross et al., 2015). Так, катехоламины и глюкокортикоиды могут стимулировать процессы глюконеогенеза (образование глюкозы из неуглеводных предшественников), гликогенолиза (расщепление гликогена до глюкозы) в печени и выброс глюкозы из печени, а также ингибировать поглощение глюкозы клетками из общего кровотока.

Генетические различия по стресс-индуцированной гипергликемии отмечены у мышей инбредных линий (Harizi et al., 2007). В ответ на ограничение подвижности, которое рассматривают как психологический стресс, у мышей линии BALB/c уровень кортикостерона в крови повышался максимально, а прирост уровня глюкозы оказался минимальным по сравнению с мышами линий DBA и C57Bl/6, в то время как у мышей линии C57Bl/6, наоборот, уровень кортикостерона в крови повышался минимально, а прирост уровня глюкозы оказался максимальным по сравнению с мышами линий DBA и BALB/c.

Повышение глюкозы в крови наблюдали и у свиней крупной белой породы после агрессивных столкновений двух незнакомых кастрированных хряков, при этом концентрация глюкозы линейно коррелировала как с агрессивностью, так и с уровнем катехоламинов (адреналином и норадреналином), тогда как уровень кортизола не коррелировал с агрессивностью (Fernandez et al., 1994).

В исследовании молекулярно-генетических механизмов варибельности стресс-чувствительности и агрессивности у свиней синтетической линии (SYN), полученной от отцов-производителей одной породы и помесных маток из шести различных коммерческих родительских линий, анализировали ассоциации ДНК маркеров 10 генов, связанных с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (ГГНС), и таких физиологических параметров, как уровни кортизола, креатинкиназы, глюкозы и лактата в плазме, а также вес надпочечников и агрессивность (Му-

рани et al., 2010). По результатам этого исследования, однонуклеотидный полиморфизм гена кортикотропин-рилизинг гормона *CRH* g.233C>T показал значительную ассоциацию с концентрацией глюкозы в плазме.

Пониженную экспрессию генов, связанных с метаболизмом глюкозы, включая транспорт глюкозы, глюконеогенез и гликолиз, отмечали у domesticiрованных хряков (или адаптированных в течение многих поколений к условиям неволи) по сравнению с дикими, переведенными из природных условий в неволю в раннем возрасте, несмотря на одинаковый рацион (He et al., 2017).

Данные, полученные на собаках разных пород, отличающихся по склонности к сахарному диабету, свидетельствуют о влиянии генетических факторов на гипергликемию, вызываемую дефицитом панкреатического гормона инсулина (Catchpole et al., 2013). Этот гормон, как известно, способствует поглощению глюкозы из общего кровотока клетками и тем самым понижению уровня глюкозы в крови. Мелкие и декоративные породы собак, наоборот, склонны к гипогликемии, причинами которой считают, в частности, нарушения в печеночных процессах глюконеогенеза и гликогенолиза, а также низкий уровень глюкокортикоидов, оказывающих стимулирующее влияние на эти процессы (Fleisher et al., 2008; Idowu, Heading, 2018).

Исследования на серебристо-черных лисицах, селекционируемых на агрессивное и толерантное отношение к человеку, могли бы внести вклад в понимание особенностей функциональной регуляции углеводного обмена у животных с генетически обусловленными различиями по стресс-реактивности ГГНС, поскольку ранее в многолетнем эксперименте, моделирующем процесс domestikации, который проводится в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), было показано, что в результате отбора серебристо-черных лисиц на ручное поведение по отношению к человеку понижается функциональная активность ГГНС по сравнению с животными, селекционируемыми на агрессивное поведение (Бажан и др., 1974; Oskina, 1996; Gulevich et al., 2004; Оськина и др., 2008; Александрович и др., 2023). К тому же у ручных лисиц понижена активность симпатической нервной системы, о чем свидетельствует более низкий уровень норадреналина в крови по сравнению с агрессивными и неселекционированными животными (Оськина и др., 2008).

Судя по данным, полученным на серых крысах и американских норках, селекционируемых на ручное и агрессивное поведение, отдельные параметры углеводного обмена могут изменяться под влиянием отбора по поведению (Albert et al., 2008; Калинина и др., 2022). Так, у ручных самцов крыс отмечали понижение уровня глюкозы в крови по сравнению с агрессивными (Albert et al., 2008), в то время как у норок, селекционируемых по поведению, данных по уровню глюкозы в крови нет, но показано, что в поджелудочной железе, двенадцатиперстной и тощей кишке у ручных норок относительно агрессивных выше активность фермента  $\alpha$ -амилазы, расщепляющей крахмал в желудочно-кишечном тракте до ди- и трисахаридов, из которых далее образуется глюкоза, всасываемая в кровь (Калинина и др., 2022). Можно заметить, что на уровень глюкозы в крови влияет не только активность панкреатической  $\alpha$ -амилазы, но и другие разнонаправленные факторы.

Кроме того, максимальную активность  $\alpha$ -амилазы в поджелудочной железе регистрировали у норок с максимальным проявлением ручного поведения, оцениваемого в баллах, а минимальную активность – у наиболее агрессивных. Такая зависимость, по-видимому, связана с тем, что вызванные отбором по поведению изменения в мозге норок, в частности уровня моноаминов в гипоталамусе (Kulikov et al., 2016), могут соответствовать баллам поведения, и сигналы от этих изменений далее через симпатoadреналовую систему могут поступать к клеткам мозгового вещества надпочечников, секретирующим норадреналин, а через гипоталамо-гипофизарную систему – к коре надпочечников, секретирующей глюкокортикоиды, которые, как и норадреналин, вовлечены в регуляцию секреции поджелудочной железы (Mössner et al., 1989; Nagain-Domaine et al., 1999).

Оставалось неизвестным, влияет ли отбор серебристо-черных лисиц по поведению (и если влияет, то как) на уровень глюкозы в крови в состоянии покоя и после стресса.

Целью данной работы было исследование влияния отбора по поведению на уровень глюкозы в крови у ручных и агрессивных серебристо-черных лисиц в состоянии покоя и после стресса.

## Материалы и методы

Исследования проводили на взрослых серебристо-черных лисицах, селекционируемых в течение более 60 лет на эмоционально положительную и агрессивно-оборонительную реакции по отношению к человеку (далее называемых ручными и агрессивными) (Belyaev, 1979; Trut et al., 2004, 2009). В третью группу входили лисицы, не подвергавшиеся сознательному отбору по поведению (далее называемые неселекционированными).

Экспериментальные животные содержались в ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Поведение лисиц оценивали ранее в тесте на перчатку в баллах. У ручных лисиц баллы колебались от +4 до +4.5, у агрессивных – от –2.5 до –3.5 и у неселекционированных – от –0.75 до +1.

Базальный уровень глюкозы в крови у самцов и самок лисиц из каждой группы определяли в утренние часы до кормления (натошак) с помощью глюкометра One Touch Basic Plus (ммоль/л). Для этого каплю крови из сосуда на кончике уха сразу наносили на тест-полоску. В каждой группе было по 12 животных у самцов и по 10 – у самок.

Исследование влияния 10-минутного рестрикционного стресса на уровни кортизола и глюкозы в крови проводили только на самках лисиц, тогда как самцы были задействованы в других экспериментах. В каждой группе было по 8 самок, не участвующих ранее в экспериментах. В качестве стрессирующего воздействия лисицам ограничивали движения, помещая в ящики для переноски, в которых одна из сторон была из металлической сетки. С целью уменьшения стрессирующего воздействия применяли ограничение подвижности (или рестриktion) в течение менее продолжительного времени (10 мин) по сравнению с более ранними исследованиями (20 мин) (Oskina, 1996).

Для определения уровня кортизола в крови пробы крови брали из *vena safena* в утренние часы до кормления. Время взятия крови у каждого животного не превышало 2–3 минут. Кровь брали сразу после 10-минутного стресса и спустя 2 ч после стресса. После взятия первого образца крови лисиц выпускали в домашние клетки. За неделю до стресса брали кровь на базальный уровень кортизола. Уровень кортизола в крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора «Кортизол-ИФА-БЕСТ» фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Спустя месяц после взятия крови из *vena safena* у тех же животных измеряли уровень глюкозы в крови в утренние часы до кормления, используя глюкометр «Сателлит-экспресс» компании «ЭЛТА» (Москва, Россия). Измерения проводили сразу после стресса и спустя 2 ч после стресса. Как и при взятии крови из *vena safena*, после первого измерения глюкозы животных выпускали в домашние клетки, а за неделю до стресса определяли базальный уровень глюкозы.

Для сравнения скорости поглощения глюкозы из общего кровотока после углеводной нагрузки у лисиц, селекционируемых по поведению, проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ) на пяти самках из каждой группы, которые ранее не участвовали в эксперименте. При этом регистрировали уровни глюкозы в крови натошак и через 10, 20 40 и 120 мин после внутривенного введения 50 % глюкозамоногидрата (0.5 г/кг).

Статистический анализ результатов выполняли с помощью пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Данные по базальному уровню глюкозы в крови у самцов и самок ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц анализировали с использованием дисперсионного анализа ANOVA для независимых измерений и последующего post-hoc анализа с помощью критерия Fisher LSD. Данные по уровню глюкозы в крови у лисиц из одной и той же селекционной группы в условиях глюкозотолерантного теста и после стресса анализировали по критерию Стьюдента для зависимых переменных, при этом лисиц из разных селекционных групп сравнивали по критерию Стьюдента для независимых переменных.



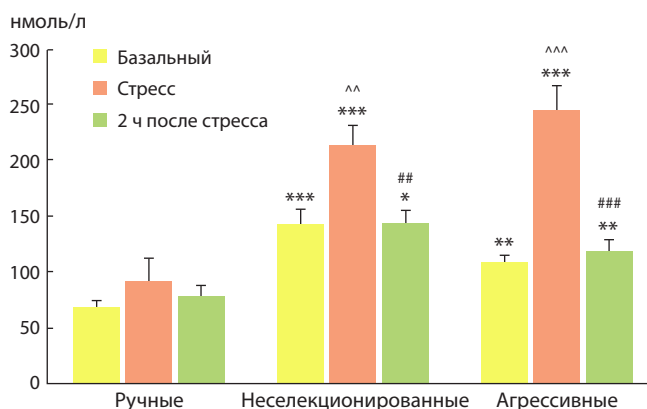
## Результаты

На рис. 1 представлены данные по базальному уровню глюкозы в периферической крови у самцов и самок ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что отбор по поведению влияет на уровень глюкозы в крови ( $F_{2,60} = 16.07$ ,  $p < 0.001$ ), а фактор пола не влияет ( $F_{1,60} = 1.64$ ,  $p > 0.05$ ), и взаимодействие факторов достоверно ( $F_{2,60} = 5.85$ ,  $p < 0.01$ ). Согласно последующему post-hoc анализу, уровень глюкозы у ручных самцов был достоверно ниже, чем у неселекционированных ( $p < 0.05$ ) и агрессивных ( $p < 0.001$ ) животных, а у неселекционированных ниже, чем у агрессивных ( $p < 0.001$ ). У ручных самок, как и у самцов, уровень глюкозы был ниже, чем у неселекционированных и агрессивных ( $p < 0.05$  в обоих случаях). Различия по уровню глюкозы, связанные с полом, регистрировались только в группе агрессивных лисиц: у самцов этот показатель был выше, чем у самок ( $p < 0.001$ ).

На рис. 2 приведены данные по уровню кортизола в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных самок лисиц после рестрикционного стресса. Уровни кортизола в крови у ручных лисиц до стресса, сразу после окончания стресса и спустя 2 ч после стресса были достоверно ниже, чем у агрессивных и неселекционированных животных. У ручных лисиц рестрикционный стресс в течение 10 мин не влиял на уровень кортизола в крови ни сразу после действия стресса, ни через 2 ч после стресса, тогда как у неселекционированных и агрессивных лисиц условия этого стресса вызывали значительное повышение уровня кортизола по сравнению с соответствующими базальными уровнями ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  соответственно). Спустя 2 ч после стресса уровень кортизола становился существенно ниже предыдущих значений сразу после стресса у неселекционированных ( $p < 0.01$ ) и агрессивных лисиц ( $p < 0.001$ ).

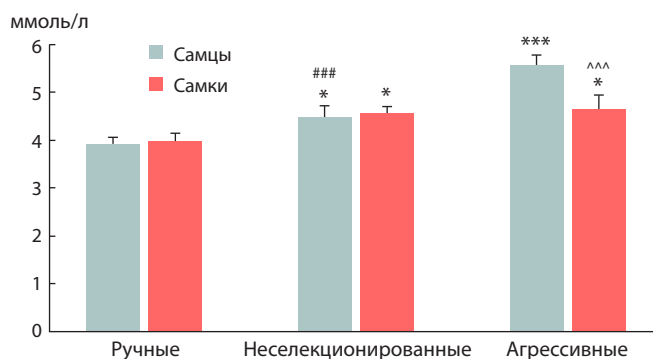
На рис. 3 представлены данные по уровню глюкозы в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных самок лисиц после рестрикционного стресса. Полученные

данные свидетельствуют, что уровень глюкозы в крови у ручных самок был достоверно ниже, чем у агрессивных до стресса ( $p < 0.01$ ), сразу после окончания стресса ( $p < 0.05$ ) и спустя 2 ч после стресса ( $p < 0.001$ ). У неселекционированных лисиц концентрация глюкозы во все исследуемые временные точки находилась на промежуточном уровне между ручными и агрессивными. При этом базальный уровень глюкозы у неселекционированных лисиц не отличался от соответствующих уровней у ручных и агрессивных лисиц, сразу после стресса он становился выше, чем у ручных ( $p < 0.01$ ), а через 2 ч после стресса – ниже, чем у агрессивных ( $p < 0.001$ ). Стресс не вызывал изменений



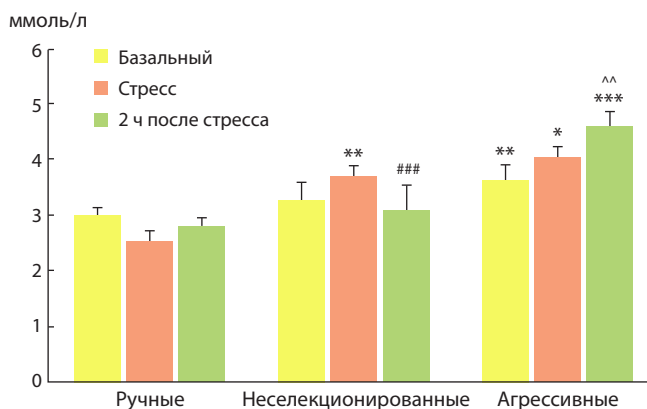
**Рис. 2.** Уровень кортизола в крови ручных, неселекционированных и агрессивных самок лисиц после стресса (нмоль/л).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с ручными самками по критерию Стьюдента для независимых переменных; ^^  $p < 0.01$ ; ^^^  $p < 0.001$  по сравнению с соответствующим базальным уровнем по критерию Стьюдента для зависимых переменных; #  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  по сравнению с предыдущим уровнем сразу после стресса по критерию Стьюдента для зависимых переменных.



**Рис. 1.** Базальный уровень глюкозы в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных самцов и самок лисиц (ммоль/л).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с ручными; ###  $p < 0.001$  по сравнению с агрессивными; ^^^  $p < 0.001$  по сравнению с соответствующими самцами согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA и последующему post-hoc Fisher LSD тесту.



**Рис. 3.** Уровни глюкозы в крови у ручных, неселекционированных и агрессивных самок лисиц после стресса (ммоль/л).

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с ручными самками (по критерию Стьюдента для независимых переменных); ^^  $p < 0.01$  по сравнению с соответствующим базальным уровнем (по критерию Стьюдента для зависимых переменных); ###  $p < 0.001$  по сравнению с агрессивными самками (по критерию Стьюдента для независимых переменных).

Коэффициенты корреляции между баллами поведения и уровнем глюкозы в крови до и после стресса у всех исследуемых лисиц независимо от поведения

|                                                                                  | До стресса | После 10 мин стресса | Спустя 2 ч после стресса |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------|--------------------------|
| Ручные, агрессивные и неселекционированные серебристо-черные лисицы ( $n = 24$ ) | -0.56*     | -0.58*               | -0.75*                   |

Примечание. Баллы поведения у неселекционированных лисиц регистрировали со знаками «+» и «-», у ручных лисиц – со знаком «+», у агрессивных – со знаком «-».

\*  $p < 0.05$  – уровень значимости для коэффициентов корреляции.

уровня глюкозы в крови у ручных и неселекционированных лисиц в течение всего исследуемого периода, тогда как у агрессивных лисиц уровень глюкозы повышался через 2 ч после стресса по сравнению с базальным ( $p < 0.01$ ).

В таблице приведены коэффициенты корреляции между баллами поведения и уровнем глюкозы в крови по суммарной выборке лисиц, состоящей из ручных, агрессивных и неселекционированных животных. Достоверная отрицательная корреляция была найдена между уровнем глюкозы в крови и баллом поведения у этих животных до стресса, сразу после окончания стресса и спустя 2 ч после стресса.

Кроме корреляции, между баллом поведения и уровнем глюкозы в крови по той же суммарной выборке оценивали корреляцию между уровнями глюкозы и кортизолом в крови. Достоверный положительный коэффициент корреляции между этими параметрами, 0.51 ( $n = 22$ ), найден только в одной исследуемой точке – сразу после окончания стресса.

На рис. 4 представлены данные по уровню глюкозы в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных самок лисиц в глюкозотолерантном тесте (ГТТ). Спустя 10 мин после введения глюкозомоногидрата уровень глюкозы у всех лисиц, независимо от поведенческой группы, достоверно повышался ( $p < 0.001$  – у ручных и неселекционированных,  $p < 0.01$  – у агрессивных).

Спустя 20 мин теста уровень глюкозы у ручных и неселекционированных лисиц становился достоверно ниже, чем предыдущие значения ( $p < 0.05$  и  $p < 0.01$  соответственно), а у агрессивных лисиц не снижался и сохранялся на предыдущем повышенном уровне, что свидетельствует о более продолжительном периоде повышенного уровня глюкозы после введения глюкозомоногидрата у этих животных, чем у ручных и неселекционированных. Только спустя 40 мин после введения глюкозомоногидрата у агрессивных лисиц уровень глюкозы становился достоверно ниже, чем предыдущие значения ( $p < 0.05$ ), а у ручных и неселекционированных понижение относительно предыдущих значений продолжалось ( $p < 0.01$  и  $p < 0.05$  соответственно). Спустя 2 ч после введения глюкозомоногидрата уровень глюкозы у ручных и агрессивных лисиц возвращался к уровню, который достоверно не отличался от базального, а у неселекционированных становился достоверно ниже соответствующего базального ( $p < 0.01$ ) и ниже, чем у ручных и агрессивных лисиц ( $p < 0.01$  и  $p < 0.05$  соответственно).

Показатели площади под кривыми ГТТ достоверно не отличались у ручных, неселекционированных и агрессивных лисиц ( $951.5 \pm 77.7$ ;  $986.8 \pm 3.3$  и  $1088.1 \pm 236.3$  соот-

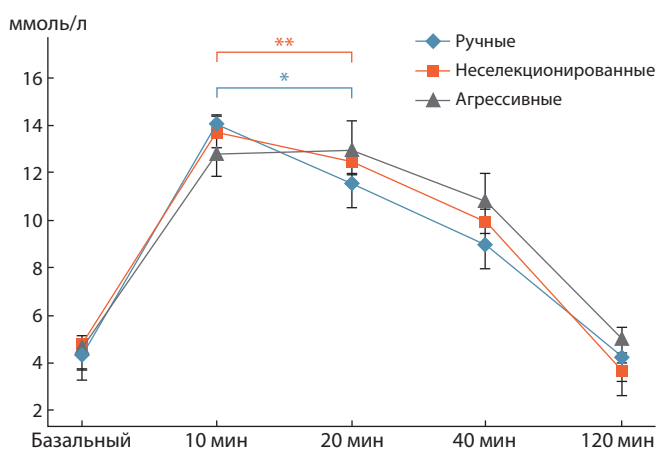


Рис. 4. Уровень глюкозы в крови у ручных, неселекционированных и агрессивных самок лисиц (ммоль/л) после введения глюкозомоногидрата (50 % в дозе 0.5 г/кг) (глюкозотолерантный тест).

\*  $p < 0.05$  и \*\*  $p < 0.01$  для сравнения значений между 10 и 20 мин по критерию Стьюдента для повторяющихся измерений.

ветственно). В отличие от результатов, представленных выше, в этом тесте не было достоверных различий по базальному уровню глюкозы в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных самок лисиц, по-видимому, из-за меньших выборок ( $n = 5$ ).

## Обсуждение

Результаты данного исследования свидетельствуют о пониженном базальном уровне глюкозы в крови у ручных самок и самок лисиц по сравнению с неселекционированными и агрессивными животными (см. рис. 1), что, по-видимому, обусловлено более низкой активностью ГН и симпатической систем у первых относительно двух других экспериментальных групп, о чем ранее было известно (Бажан и др., 1974; Оськина, Трут, 1985; Gulevich et al., 2004; Оськина и др., 2008). К тому же данные настоящего исследования вновь подтверждают более низкий базальный уровень кортизола у ручных самок по сравнению с агрессивными и неселекционированными самками (см. рис. 2).

Как уже упоминалось выше, глюкокортикоиды и норадреналин участвуют в регуляции уровня глюкозы в крови, активируя процессы глюконеогенеза (или образование глюкозы из неуглеводных предшественников), гликогенолиза (расщепление гликогена до глюкозы) в печени и

выброс глюкозы из печени, но ингибируя поглощение глюкозы клетками из общего кровотока (Stover et al., 2002; Barth et al., 2007; Magomedova, Cummins, 2015; Ross et al., 2015). В исследовании на серых самцах крыс, селекционируемых по поведению, ручные животные отличались от агрессивных пониженным уровнем кортизола и глюкозы в крови (Plyusnina, Oskina, 1997; Albert et al., 2008), что согласуется с данными, полученными на лисах.

У домашних свиней, которые в течение многих поколений находились в условиях неволи, показана пониженная экспрессия генов, связанных с метаболизмом глюкозы, включая транспорт глюкозы, глюконеогенез и гликолиз, по сравнению с дикими, переведенными из природных условий в неволю в раннем возрасте, несмотря на одинаковый рацион (He et al., 2017). Возможно, отбор лисиц на доместикационное и агрессивное поведение влияет на те же процессы в метаболизме глюкозы, в результате чего уровень глюкозы в крови у ручных лисиц становится ниже, чем у агрессивных.

Что касается полученных нами значений уровня глюкозы в крови у серебристо-черных лисиц, то они были близки к тем, которые отмечали у собак (3.3–6.2 ммоль/л) (Idowu, Heading, 2018). Найденные у агрессивных лисиц половые различия по базальному уровню глюкозы в крови, т.е. более высокие показатели у самцов, чем у самок (см. рис. 1), согласуются с результатами, полученными на мышах (Harizi et al., 2007). Такой половой диморфизм, по мнению этих ученых, обусловлен участием андрогенов в индукции инсулинорезистентности. К сожалению, в исследовании на серых крысах, селекционируемых по поведению, данные по уровню глюкозы в крови приводятся только у самцов (Albert et al., 2008).

Условия рестрикционного стресса не оказывали влияния на уровни кортизола и глюкозы в крови у ручных самок лисиц, отличающихся пониженной реакцией на стресс, ни в одной исследуемой точке: сразу после стресса и через 2 ч после стресса, тогда как у неселекционированных и агрессивных лисиц уровень кортизола в крови достоверно повышался сразу после стресса, а уровень глюкозы либо совсем не изменялся, как у первых, либо повышался только через 2 ч после стресса, как у последних, отличающихся повышенной стресс-реактивностью.

В исследовании на собаках i.c.v. (введение в желудочек мозга – intracerebroventricular) инъекции карбохола (аналога ацетилхолина) повышали уровень катехоламинов и кортизола, тем самым имитируя действие стресса, и вызывали рост не только продукции, но и абсорбции глюкозы, что приводило к незначительному, но достоверному увеличению уровня глюкозы в крови не ранее чем через 15 мин после инъекции (Miles et al., 1991).

В связи с этим можно предполагать, что повышение уровня глюкозы в крови у неселекционированных и агрессивных лисиц под влиянием стресса могло происходить несколько позднее, чем через 10 мин, тогда как наблюдаемое у агрессивных лисиц повышение уровня глюкозы в крови через 2 ч после стресса по сравнению с исходным уровнем может быть вызвано длительными

интенсивными процессами продукции и/или поступления глюкозы в кровь на фоне замедления ее абсорбции из общего кровотока.

Отрицательная корреляция между уровнем глюкозы в крови и баллом поведения, найденная по суммарной выборке лисиц независимо от поведения до и после стресса (см. таблицу), согласуется с данными о корреляции уровня глюкозы в крови и степени агрессивности у свиней после столкновений двух незнакомых самцов (Fernandez et al., 1994). Различия по знаку корреляции у лисиц и свиней (отрицательная у первых и положительная у последних) могут быть связаны с тем, что, в отличие от свиней, поведение самых агрессивных лисиц оценивали минимальным баллом, а самых ручных – максимальным. Тем самым и у лисиц, и у свиней чем больше агрессивность, тем выше уровень глюкозы в крови.

В том же исследовании на свиньях показана корреляция уровня глюкозы и катехоламинов (адреналина и норадреналина) в крови, а, как уже упоминалось выше, у ручных лисиц уровень норадреналина в крови ниже, чем у агрессивных и неселекционированных (Оськина и др., 2008).

Найденная корреляция между баллом поведения и уровнем глюкозы в крови у лисиц, по-видимому, связана с тем, что вызванные отбором по поведению изменения в мозге лисиц, в частности уровней тирозингидроксилазы (фермента синтеза катехоламинов) и серотонина (Дыгало и др., 1988; Попова, 2017), могут соответствовать баллам поведения, и сигналы от таких изменений далее через симпатoadреналовую систему могут поступать к клеткам мозгового вещества надпочечников, секретирующим норадреналин, а также через гипоталамо-гипофизарную систему – к коре надпочечников, секретирующей глюкокортикоиды. В свою очередь, и норадреналин, и глюкокортикоиды участвуют в регуляции процессов глюконеогенеза, гликогенолиза в печени, выброса глюкозы из печени и поглощения глюкозы клетками из общего кровотока (Stover et al., 2002; Barth et al., 2007; Magomedova, Cummins, 2015; Ross et al., 2015).

Судя по показателям площади, под кривыми глюкозотолерантного теста скорость утилизации глюкозы после углеводной нагрузки не различалась у ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц. Вместе с тем у агрессивных самок лисиц на начальном этапе теста после введения глюкозамонгидрата отмечается более продолжительный период повышенного уровня глюкозы после введения глюкозамонгидрата, чем у ручных и неселекционированных животных, поскольку спустя 20 мин уровень глюкозы у них остается на повышенном уровне, а не становится ниже, как у ручных и агрессивных (рис. 4).

Через 2 ч после введения глюкозамонгидрата у ручных и агрессивных лисиц уровень глюкозы возвращается к исходному, тогда как у неселекционированных он оказывается достоверно ниже исходного и соответствующих уровней у ручных и агрессивных лисиц, что может свидетельствовать о более интенсивном поглощении глюкозы из кровотока у неселекционированных животных в этот



период. Легкую гипогликемию отмечали и у собак через 3 ч после орального введения глюкозы, при этом максимальные значения регистрировали через 30–60 мин, а возвращение к исходному уровню – через 2 ч после введения глюкозы (Kaneko, 1997).

## Заключение

Таким образом, отбор серебристо-черных лисиц по реакции на человека влияет на базальный уровень глюкозы в крови независимо от пола, что может быть связано с изменениями активности симпатической и ГГН систем в процессе отбора. У ручных самцов и самок лисиц базальный уровень глюкозы в крови был ниже, чем у агрессивных и неселекционированных.

Условия стресса не оказывали влияния на уровень глюкозы в крови у ручных и неселекционированных самок лисиц, а у агрессивных вызывали отдаленный эффект, повышая этот показатель только через 2 ч после стресса. Хотя на основании показателей площади под кривыми толерантность к глюкозе не изменялась при отборе лисиц по поведению, на начальном этапе ГТТ у агрессивных самок отмечали более продолжительный период повышенного уровня глюкозы в крови, чем у ручных и неселекционированных животных.

**Соблюдение этических стандартов.** Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами работы с лабораторными хищными млекопитающими» (ГОСТ 33217-2014) и международными европейскими биоэтическими стандартами (директива 2010/63/EU).

## Список литературы / References

- Александрович Ю.В., Антонов Е.В., Шихевич С.Г., Харламова А.В., Мейстер Л.В., Маковка Ю.В., Шепелева Д.В., Гулевич Р.Г., Гербек Ю.Э. Профиль экспрессии генов, связанных с регуляцией стресса, поведения и нейрогенеза, вдоль дорзовентральной оси в гиппокампе у взрослых ручных и агрессивных лисиц. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(6):651-661. doi 10.18699/VJGB-23-76
- [Alexandrovich Yu.V., Antonov E.V., Shikhevich S.G., Kharlamova A.V., Meister L.V., Makovka Y.V., Shepeleva D.V., Gulevich R.G., Herbeck Yu.E. The expression profile of genes associated with behavior, stress, and adult neurogenesis along the hippocampal dorsoventral axis in tame and aggressive foxes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(6):651-661. doi 10.18699/VJGB-23-76]
- Бажан Н.М., Красс П.М., Колпаков М.Г., Трут Л.Н. Изменение секреторной активности коры надпочечников у серебристо-черных лисиц в процессе доместикации. *Доклады Академии наук СССР*. 1974;216(4):922-924
- [Bazhan N.M., Krass P.M., Kolpakov M.G., Trut L.N. Change in the secretory activity of the adrenal cortex in silver foxes in the process of domestication. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of USSR*. 1974;216(4):922-924 (in Russian)]
- Дыгало Н.Н., Быкова Т.С., Наumenko Е.В. Активность тирозингидроксилазы головного мозга у селекционируемых по поведению серебристо-черных лисиц. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 1988;24(4):503-508
- [Dygalo N.N., Bykova T.S., Naumenko E.V. Brain tyrosine hydroxylase activity in behavior-selected silver foxes. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 1988;24(4):503-508 (in Russian)]
- Калинина С.Н., Илюха В.А., Трапезов О.В., Морозов А.В., Трапезова Л.И., Некрасова М.А., Степанова М.А., Сысоева Е.А. Активность пищеварительных ферментов у американских норков (*Neovison vison*) при отборе на агрессивное и ручное поведение. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2022;58(1):61-68. doi 10.31857/S0044452922010028
- [Kalinina S.N., Ilyukha V.A., Trapezev O.V., Morozov A.V., Trapezeva L.I., Nekrasova M.A., Stepanova M.A., Sysoeva E.A. Activity of digestive enzymes in the American mink (*Neovison vison*) selected for tameness and defensive aggression toward humans. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(1):64-72. doi 10.1134/S0022093022010069]
- Осыкина И.Н., Трут Л.Н. Возрастные изменения уровня кортикостероидов в крови у лисиц разного поведения. *Докл. АН СССР*. 1985;281(3):1010-1014
- [Oskina I.N., Trut L.N. Age-related changes in blood corticosteroid levels in foxes of different behaviors. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of USSR*. 1985;281(3):1010-1014 (in Russian)]
- Осыкина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г., Плюснина И.З., Гулевич Р.Г. Изменения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем при отборе животных на доместикационное поведение. *Информационный вестник ВОГиС*. 2008;12(1/2):39-49
- [Oskina I.N., Herbeck Yu.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G. Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2008;12(1/2):39-49 (in Russian)]
- Попова Н.К. Доместикация и мозг: сорок лет спустя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(4):414-420. doi 10.18699/VJ17.259
- [Popova N.K. The domestication and the brain: forty years after. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2017;21(4):414-420. doi 10.18699/VJ17.259 (in Russian)]
- Albert F.W., Shchepina O., Winter C., Römpfer H., Teupser D., Palme R., Ceglarek U., ... Thierry J., Morgenstern R., Plyusnina I.Z., Schöneberg T., Pääbo S. Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans. *Horm Behav*. 2008;53(3):413-421. doi 10.1016/j.yhbeh.2007.11.010
- Barth E., Albuszies G., Baumgart K., Matejovic M., Wachter U., Vogt J., Radermacher P., Calzia E. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S508-S518. doi 10.1097/01.CCM.0000278047.06965.20
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J Hered*. 1979;70:301-308
- Catchpole B., Adams J.P., Holder A.L., Short A.D., Ollier W.E.R., Kennedy L.J. Genetics of canine diabetes mellitus: are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs? *Vet J*. 2013;195(2):139-147. doi 10.1016/j.tvjl.2012.11.013
- Fernandez X., Meunier-Salaün M.-C., Mormede P. Agonistic behavior, plasma stress hormones, and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs: interrelationships and effect of dominance status. *Physiol Behav*. 1994;56(5):841-847. doi 10.1016/0031-9384(94)90313-1
- Fleischer S., Sharkey M., Mealey K., Ostrander E.A., Martinez M. Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. *AAPS J*. 2008;10(1):110-119. doi 10.1208/s12248-008-9011-1
- Gulevich R.G., Oskina I.N., Shikhevich S.G., Fedorova E.V., Trut L.N. Effect of selection for behavior on pituitary-adrenal axis and pro-opiomelanocortin gene expression on silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Physiol Behav*. 2004;82(2-3):513-518. doi 10.1016/j.physbeh.2004.04.062
- Harizi H., Homo-Delarche F., Amrani A., Coulaud J., Mormède P. Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticoid sensitivity. *J Neuroimmunol*. 2007;189(1-2):59-68. doi 10.1016/j.jneuroim.2007.06.019



- He D., Ma J., Long K., Wang X., Li X., Jiang A., Li M. Differential expression of genes related to glucose metabolism in domesticated pigs and wild boar. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(8):1478-1483. doi 10.1080/09168451.2017.1322893
- Idowu O., Heading K. Hypoglycemia in dogs: causes, management, and diagnosis. *Can Vet J.* 2018;59(6):642-649
- Kaneko J.J. Carbohydrate metabolism and its diseases. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, 1997;45-81. doi 10.1016/B978-012396305-5/50004-X
- Kulikov A.V., Bazhenova E.Yu., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Trapezoza L.I., Terenina E.E., Mormeded R., Popova N.K., Trapezov O.V. Interplay between aggression, brain monoamines and fur color mutation in the American mink. *Genes Brain Behav.* 2016;15(8):733-740. doi 10.1111/gbb.12313
- Magomedova L., Cummins C.L. Glucocorticoids and metabolic control. In: Herzig S. (Ed.) *Metabolic Control. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 233. Springer, 2015;73-93. doi 10.1007/164\_2015\_1
- Miles P.D., Yamatani K., Lickley H.L., Vranic M. Mechanism of glucoregulatory responses to stress and their deficiency in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(4):1296-1300. doi 10.1073/pnas.88.4.1296
- Mössner J., Böhm S., Fischbach W. Role of glucocorticosteroids in the regulation of pancreatic amylase synthesis. *Pancreas.* 1989;4(2):194-203. doi 10.1097/00006676-198904000-00008
- Muráni E., Ponsuksili S., D'Eath R.B., Turner S.P., Kurt E., Evans G., Thölking L., Klont R., Foury A., Mormède P., Wimmers K. Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genet.* 2010;11:74. doi 10.1186/1471-2156-11-74
- Nagain-Domaine C., Presset O., Chariot J., Roze C. Modulation of external pancreatic secretion by endogenous norepinephrine: study with a norepinephrine uptake blocker in the rat. *Pancreas.* 1999;18:300-307. doi 10.1097/00006676-199904000-00012
- Oskina I.N. Analysis of the functional state of the pituitary-adrenal axis during postnatal development of domesticated silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Scientific.* 1996;20(2):159-167
- Plyusnina 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. doi 10.1016/S0031-9384(96)00445-3
- Ross A.P., Darling J.N., Parent M.B. Excess intake of fat and sugar potentiates epinephrine-induced hyperglycemia in male rats. *J Diabetes Complications.* 2015;29(3):329-337. doi 10.1016/j.jdiacomp.2014.12.017
- Stover J.F., Sakowitz O.W., Thomale U.W., Kroppenstedt S.N., Unterberg A.W. Norepinephrine-induced hyperglycemia does not increase cortical lactate in brain-injured rats. *Intensive Care Med.* 2002;28(10):1491-1497. doi 10.1007/s00134-002-1431-2
- Trut L.N., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. An experiment on fox domestication and debatable issues of evolution of the dog. *Russ J Genet.* 2004;40:644-655. doi 10.1023/B:RUGE.0000033312.92773.c1
- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *BioEssays.* 2009;31(3):349-360. doi 10.1002/bies.200800070

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.12.2025. После доработки 29.04.2026. Принята к публикации 04.05.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-90

## Полногеномное исследование генетических детерминант преждевременного старения крыс OXYS

В.М. Петрова <sup>1</sup> , М.С. Протасова <sup>1, 2</sup>, А.Д. Манахов <sup>1, 2</sup>, Н.А. Стефанова <sup>3</sup>, Н.Г. Колосова <sup>3</sup>, Е.И. Рогаев <sup>1, 4</sup> 

<sup>1</sup> Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, США

 petrova.vm@talantiuspeh.ru; evivrecc@gmail.com

**Аннотация.** Возраст – основной фактор риска ассоциированных со старением заболеваний, раннее развитие которых лежит в основе преждевременного старения, а более позднее – обеспечивает долголетие. Неблагоприятные генетические варианты способствуют преждевременному старению и его множественным проявлениям – увеличению числа коморбидных состояний. Установление предпосылок преждевременного старения и разработка подходов к его профилактике – основной резерв увеличения здорового периода жизни людей, что обуславливает необходимость в фундаментальных исследованиях на моделях животных. Нами проведено полногеномное секвенирование (с глубиной покрытия >25х) крыс линии OXYS – модели преждевременного старения, которое сопровождается ранним развитием комплекса гериатрических заболеваний: катаракты, ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации (ВМД), признаков болезни Альцгеймера (БА), остеопороза, саркопении и гипертрофической кардиомиопатии (контроль – родительская линия крыс Wistar/Jcgn). Поиск однонуклеотидных вариантов, инсерций-делеций (инделов) и вариаций числа копий геномных регионов (CNV) и сравнительный геномный анализ выявили генетические варианты, уникальные для крыс OXYS и не встречающиеся среди других линий крыс. Обнаружены: крупная делеция в энхансере гена *Fat1*; делеции в промоторных регионах генов *Abcf1* и *Gsta6*; а также миссенс-варианты в генах *Cic*, *Akap6*, *Nqo2*, *Cerkl*, *Bfsp1* и *Stua5*, приводящие к аминокислотным заменам в высококонсервативных регионах белков. Проведенный биоинформатический анализ показал, что данные варианты, вероятно, вносят вклад в развитие ключевых проявлений преждевременного старения у линии крыс OXYS. А именно: делеции в энхансере *Fat1* и промоторе *Gsta6*, а также миссенс-замены в *Cic*, *Akap6* и *Nqo2* могут способствовать ранней нейродегенерации и когнитивному дефициту, нарушая нейрогенез, снижая выживаемость нейронов и их антиоксидантную защиту; делеция в промоторной области *Abcf1* и миссенс-варианты в *Cerkl* могут приводить к возникновению признаков ВМД, нарушая гомеостаз сетчатки и ослабляя защиту фоторецепторов и клеток пигментного эпителия сетчатки (РПЭ) от окислительного стресса и апоптоза соответственно, а миссенс-замена в *Bfsp1* – к раннему развитию катаракты через снижение стабильности промежуточных филаментов хрусталика. Миссенс-варианты в *Stua5* и *Akap6* могут способствовать развитию саркопении и кардиомиопатии: замена в *Stua5* – за счет дестабилизации миофибрилл в кардиомиоцитах и скелетных мышцах, а замена в *Akap6* – за счет нарушения регенерации скелетных мышц и структурной организации кардиомиоцитов.

**Ключевые слова:** преждевременное старение; возраст-ассоциированные заболевания; линия крыс OXYS; полногеномное секвенирование; генетические варианты; вариации числа копий геномных регионов

**Для цитирования:** Петрова В.М., Протасова М.С., Манахов А.Д., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Рогаев Е.И. Полногеномное исследование генетических детерминант преждевременного старения крыс OXYS. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):883-898. doi 10.18699/vjgb-26-90

**Финансирование.** При поддержке гранта по государственной программе федеральной территории «Сириус» «Технологии старения и долголетия», соглашение № 18-03 от 10.09.2024, проект IMB-BFT-2403 (Протасова М.С.).

## Whole genome sequencing identifies genetic variants associated with senescence-accelerated phenotype of OXYS rats

V.M. Petrova <sup>1</sup> , M.S. Protasova <sup>1, 2</sup>, A.D. Manakhov <sup>1, 2</sup>, N.A. Stefanova <sup>3</sup>, N.G. Kolosova <sup>3</sup>, E.I. Rogaev <sup>1, 4</sup> 

<sup>1</sup> Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, Russia

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> UMass Chan Medical School, Department of Psychiatry, Shrewsbury, United States

 petrova.vm@talantiuspeh.ru; evivrecc@gmail.com

**Abstract.** Age is the primary risk factor for age-related diseases, the early onset of which manifests as premature aging, whereas delayed development forms the basis for healthy aging and longevity. Adverse genetic variants contribute to premature aging and its diverse manifestations, including increased multimorbidity. Identifying the genetic underpinnings of premature aging and developing preventive approaches are essential to extending the human healthspan, which requires fundamental research using animal models. In this study, we performed whole-genome sequencing (coverage depth >25×) of OXYS rats – a unique model of premature aging characterized by the early onset of geriatric disorders, including cataracts, AMD-like retinopathy, Alzheimer's disease-like pathology, osteoporosis, sarcopenia, and hypertrophic cardiomyopathy – using the parental Wistar/Icgn rat strain as a control. The screening for single-nucleotide variants (SNVs), short insertions/deletions (indels), and copy number variations (CNVs) and comparative genomic analysis revealed genetic variants unique to OXYS rats that are absent in other rat strains. Specifically, we identified a large deletion in the *Fat1* enhancer, deletions in the promoter regions of *Abcf1* and *Gsta6*, and missense variants in *Cic*, *Akap6*, *Nqo2*, *Cerkl*, *Bfsp1*, and *Cmya5* that lead to amino acid substitutions in highly conserved protein regions. Bioinformatic analysis suggested that these variants may contribute to the key features of premature aging in OXYS rats. Notably, deletions in the *Fat1* enhancer and *Gsta6* promoter, alongside missense substitutions in *Cic*, *Akap6*, and *Nqo2*, may drive early neurodegeneration and cognitive deficits by disrupting neurogenesis, reducing neuronal survival, and impairing antioxidant defense. The deletion in the *Abcf1* promoter and the missense variants in *Cerkl* may induce retinopathy features by disrupting retinal homeostasis and weakening the protection of photoreceptors and retinal pigment epithelium (RPE) cells against oxidative stress and apoptosis. Furthermore, the missense substitution in *Bfsp1* likely contributes to early cataract development by reducing the stability of lens intermediate filaments. Finally, missense variants in *Cmya5* and *Akap6* may promote sarcopenia and cardiomyopathy via the destabilization of myofibrils in skeletal muscles and cardiomyocytes (*Cmya5*) and through impaired skeletal muscle regeneration and structural disorganization of cardiomyocytes (*Akap6*).

**Key words:** premature aging; age-associated diseases; OXYS rat strain; whole genome sequencing; genetic variants; copy number variations

**For citation:** Petrova V.M., Protasova M.S., Manakhov A.D., Stefanova N.A., Kolosova N.G., Rogaev E.I. Whole genome sequencing identifies genetic variants associated with senescence-accelerated phenotype of OXYS rats. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(6):883-898. doi 10.18699/vjgb-26-90

## Введение

Возрастные заболевания – естественное следствие процесса старения. Их развитие в более раннем возрасте становится проявлением преждевременного старения, тогда как их более поздняя манифестация – основой здорового старения, долголетия. Достижения в области лечения ассоциированных со старением заболеваний привели к тому, что продолжительность жизни в последние несколько десятилетий неуклонно растет, в то время как ее здоровый период увеличивается заметно медленнее. При этом более 60 % людей старше 65 лет страдают не одним, а несколькими гериатрическими расстройствами (Figueira et al., 2016), разнообразие и возраст манифестации которых определяются генетическими и экологическими факторами, качеством жизни и доступностью медицины. В этой ситуации выявление молекулярно-генетических предпосылок преждевременного старения и разработка надежных методов его профилактики становятся основой для увеличения здорового периода жизни людей.

Для решения этих задач необходимы фундаментальные исследования на моделях животных. В качестве одной из таких моделей используется линия крыс OXYS (ИЦиГ СО РАН) – уникальная модель преждевременного старения, проявлением которого становится раннее развитие комплекса гериатрических заболеваний (Kolosova et al., 2014). Линия создана в 70-е годы прошлого века отбором крыс Wistar/Icgn по признаку ранней спонтанной катаракты. В пяти первых поколениях ее развитие провоцировали нагрузкой галактозой, в дальнейшем проводился отбор по ранней спонтанной катаракте, сцепленно с которой животные унаследовали синдром преждевременного старения.

На фоне умеренно повышенного артериального давления у крыс OXYS спонтанно развиваются катаракта, гипертрофическая кардиомиопатия, саркопения, остеопороз, ретинопатия, аналогичная возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей (Kolosova et al., 2014). Также у крыс OXYS развиваются все ключевые патогенетические и «клинические» признаки болезни Альцгеймера (БА) при отсутствии мутаций в генах (*App*, *Psen1* и *Psen2*), специфичных для семейной формы БА, что позволяет рассматривать их как модель наиболее распространенной (>95 %) спорадической формы этого заболевания (Stefanova et al., 2014). Все эти проявления преждевременного старения могли быть связаны с окислительным стрессом – дисбалансом в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК), однако повышенный уровень окислительных повреждений липидов, белков и ДНК регистрируется в тканях крыс OXYS позже, чем возникают признаки преждевременного старения (Kolosova et al., 2006). Митохондриальная дисфункция, выявленная сначала в печени (Kolosova et al., 2001), затем в мышцах (Vays et al., 2014) и миокарде (El'darov et al., 2015), в структурах головного мозга (Tyumentsev et al., 2018) и сетчатке (Zhdankina et al., 2023), считается наиболее вероятной причиной преждевременного старения крыс OXYS. Связь между митохондриальной дисфункцией и преждевременным старением крыс OXYS подтверждается также тем, что в генах, связанных с митохондриальными функциями, на основе анализа транскриптомов головного мозга обнаружены одонуклеотидные варианты (ОНВ), способные приводить к аномалиям в структуре и/или функциях белков и влиять на развитие характерного для крыс OXYS фенотипа (Devyatkin et al., 2020a, b).

Цель настоящего исследования – идентификация генетических вариантов разных типов: ОНВ, коротких инсерций/делеций (инделов) и вариаций числа копий геномных регионов (CNV), с которыми может быть связано формирование фенотипа преждевременного старения у крыс OXYS.

## Материалы и методы

**Животные.** Работа выполнена на самцах крыс линии OXYS ( $n = 3$ ) и родительской линии Wistar/ICgn ( $n = 3$ ) из Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях ( $22 \pm 2$  °C и 12-часовой цикл свет/темнота) в клетках ( $57 \times 36 \times 20$  см) при свободном доступе к воде и пище – стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (БиоПро, Россия).

Содержание животных (включая соответствующие помещения, квалифицированный персонал, необходимую документацию) и все эксперименты с животными осуществляли в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. Исследования одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (№ 85/1 от 18.06.2021).

**Биоматериал.** После эвтаназии углекислым газом были проведены декапитация и забор фрагментов мозжечка массой 30 мг от трех крыс линии OXYS и трех крыс родительской линии Wistar/ICgn в возрасте 3 месяцев в пробирку объемом 1.5 мл. Биоматериал был заморожен в жидком азоте, а затем хранился при  $-80$  °C.

**Выделение ДНК.** ДНК из ткани мозжечка была выделена с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Качество и количество выделенной геномной ДНК оценивали с помощью микрообъемного УФ-спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

**Подготовка библиотек и полногеномное секвенирование.** Библиотеки для полногеномного секвенирования были приготовлены с использованием набора TruSeq DNA PCR-Free (Illumina, США). Качество полученных библиотек оценивали с помощью капиллярного гель-электрофореза на приборе TapeStation 4150 (Agilent Technologies, США), молярность определяли методом количественной ПЦР набором KAPA Library Quantification Kit (Roche Sequencing Solutions, США). Секвенирование было выполнено на приборе NovaSeq 6000 (Illumina, США) в режиме парных чтений 151+151 п.н.

**Обработка данных секвенирования.** Качество полученных прочтений оценивали с помощью программного обеспечения FastQC 0.11.9 (Andrews, 2010). Для удаления адаптеров и фильтрации по качеству применяли программное обеспечение AdapterRemoval 2.3.3 с параметрами --minquality 20, --trimqualities и --minlength 50 (Schubert et al., 2016). После предобработки прочтения картирова-

лись на mRatBN7.2 сборку генома *Rattus norvegicus* с использованием алгоритма BWA-MEM из программного обеспечения BWA 0.7.17 (Li H., Durbin, 2009). Дубликаты прочтений маркировались командой MarkDuplicates из инструмента Picard v2.26.11 (Broad Institute, 2022). Качество выравнивания анализировалось с помощью набора программ Samtools v1.9 (Li H. et al., 2009). Глубина покрытия геномов оценивалась функцией CollectWgsMetrics из Picard v2.26.11 (Broad Institute, 2022).

**Поиск, аннотация и отбор ОНВ и инделов.** Позиции и генотипы ОНВ и инделов определяли с помощью команды HaplotypeCaller из пакета программ GATK v4.2.2.0 (McKenna et al., 2010). Анализ главных компонент (PCA) выполнен в программном пакете PLINK 1.9 (Purcell et al., 2007) и визуализирован в RStudio 4.3.2 при помощи библиотек tidyverse и ggplot2 (Wickham, 2016; Wickham et al., 2019). Для отбора и фильтрации генотипов использовали собственный скрипт на Python. Скрипт принимает на вход VCF-файл и отбирает варианты с минимальным покрытием  $10\times$ , гомозиготные по альтернативному аллелю у всех образцов тестовой группы (OXYS) и отсутствующие в гомозиготном состоянии у контрольной группы (Wistar/ICgn).

Для аннотации и классификации каждого ОНВ и индела использовали Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) версии 113 (McLaren et al., 2016). Сравнение генотипов ОНВ и инделов крыс OXYS с генотипами 146 линий крыс из базы данных Rat Genome Database (de la Cruz et al., 2004) осуществлялось с помощью инструмента BCFtools 1.15 (Danecek et al., 2021). Все отобранные генетические варианты проходили визуальную верификацию в геномном браузере Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011). Анализ аминокислотных замен проводился для канонических транскриптов генов согласно аннотации Ensembl версии 115 (Dyer et al., 2025). Консервативность аминокислотных остатков оценивали на основе множественных выравниваний ортологов плацентарных млекопитающих (табл. S1 Приложения)<sup>1</sup> и грызунов и родственных им видов (табл. S2), собранных из базы данных Ensembl версии 115 (Dyer et al., 2025). Поиск паралогов также проводился в базе данных Ensembl версии 115 (Dyer et al., 2025). Визуализация множественных выравниваний осуществлялась при помощи программного обеспечения UGENE 45.0 (Okonechnikov et al., 2012). Предсказание и визуализация структур белков были сделаны в AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024).

**Поиск, аннотация и отбор CNV.** Поиск CNV в геномах OXYS и Wistar/ICgn крыс проводился программой CNVpytor 1.3.1 с размером окна 100 п.н., рекомендованным для покрытия  $20\text{--}30\times$  (Abyzov et al., 2011; Suvakov et al., 2021). Для уточнения координат CNV и генотипирования образцов использовалась программа Smoove 0.2.8 (Pedersen et al., 2020). Для последующей аннотации исключались CNV, локализованные в регионах с низким качеством картирования. Отбор генотипов проводился с помощью инструмента BCFtools 1.15 (Danecek et al., 2021).

<sup>1</sup> Табл. S1–S5, рис. S1–S25 и список S1 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx44.pdf>



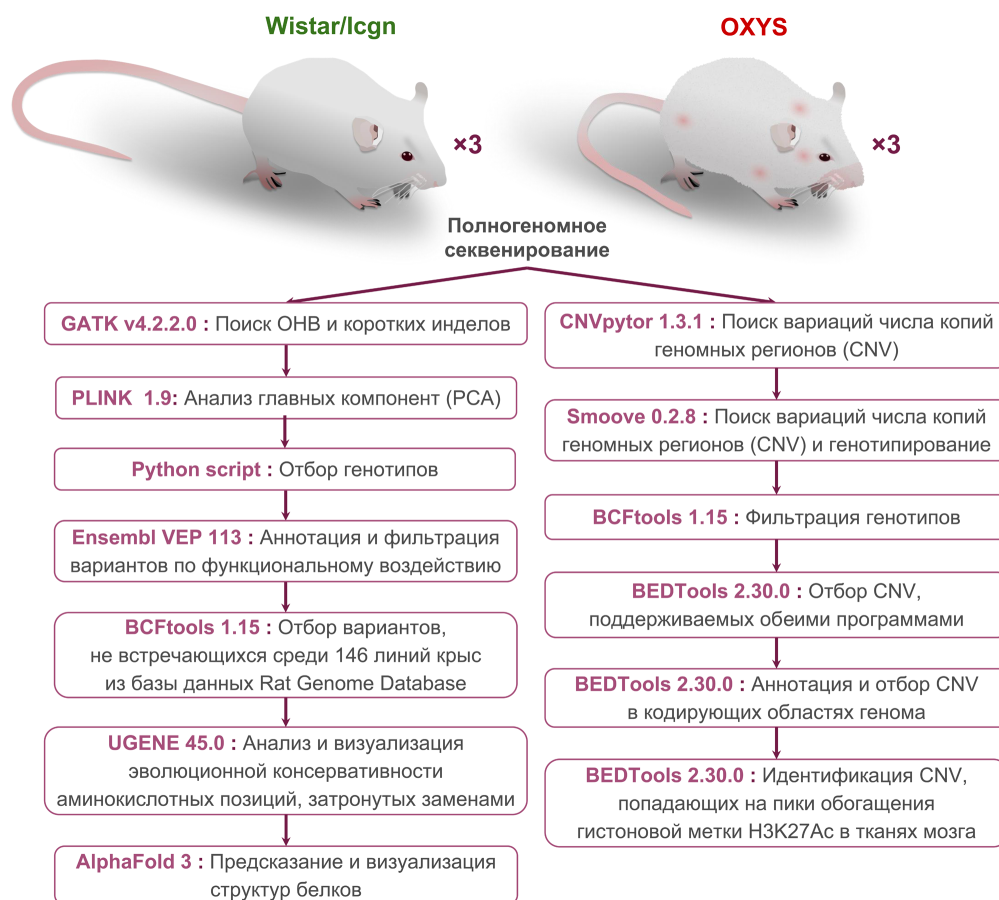


Рис. 1. Схематичное описание биоинформатического анализа геномов крыс линий Wistar/ICGN и OXYS.

Аннотация CNV была выполнена путем пересечения их координат с геномной аннотацией сборки mRatBN7.2 *Rattus norvegicus* с использованием команды 'bedtools intersect' из программного обеспечения BEDTools 2.30.0 (Quinlan, Hall, 2010). Для пересечения координат CNV с пиками обогащения гистоновой метки H3K27Ac, полученными программой MACS2 v2.2.6 (Zhang et al., 2008), также использовался инструмент BEDTools 2.30.0 (Quinlan, Hall, 2010). Визуализация CNV выполнена в IGV (Robinson et al., 2011).

Схематичное описание биоинформатического анализа представлено на рис. 1.

## Результаты

### Анализ главных компонент PCA

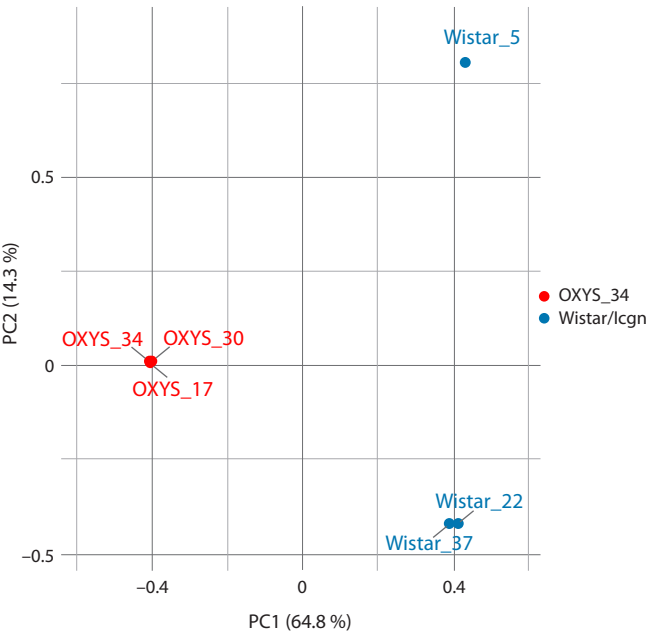
Глубина покрытия геномов каждого образца представлена в табл. S3. Для крыс OXYS средняя глубина покрытия составила 32.36×, для Wistar/ICGN – 28.88×. В их геномах было выявлено в общей сложности 12412404 генетических варианта, отличных от референсной сборки *Rattus norvegicus* mRatBN7.2.

На основе генотипов крыс OXYS и Wistar/ICGN был проведен PCA и построен двумерный график для первой (PC1) и второй (PC2) компонент, суммарно составляю-

щих 79.1 % дисперсии данных (рис. 2). Группы OXYS и Wistar/ICGN ожидаемо образовали отдельные кластеры. Следует отметить, что кластер крыс OXYS (обозначены красным) плотно сгруппирован, что указывает на генетическую однородность, характерную для инбредных линий животных.

### Анализ ОНВ и инделов

Поскольку линия крыс OXYS является инбредной, ожидается, что генетические варианты, определяющие ее специфический фенотип, зафиксированы у всех особей в гомозиготном состоянии. Из 12009286 хромосомных генетических вариантов были отобраны 1363823 позиции, по которым все три OXYS крысы были гомозиготами (с глубиной покрытия  $\geq 10$ ) по одному и тому же аллелю. Среди животных из контрольной линии Wistar/ICGN гомозиготные особи по этому аллелю отсутствовали. Затем были отобраны варианты, приводящие к функционально значимым нарушениям в канонических транскриптах генов: вызывающие преждевременную терминацию трансляции, потерю функции гена или запуск нонсенс-опосредованного распада мРНК в соответствии с классификацией Sequence Ontology (Eilbeck et al., 2005) – 78 вариантов. Также были отобраны миссенс-варианты, приводящие к замене аминокислоты в транслируемом белке и предска-



**Рис. 2.** Анализ главных компонент (PCA), выполненный с использованием программного обеспечения PLINK 1.9 на основе генотипов крыс линий Wistar/Icgn и OXYS.

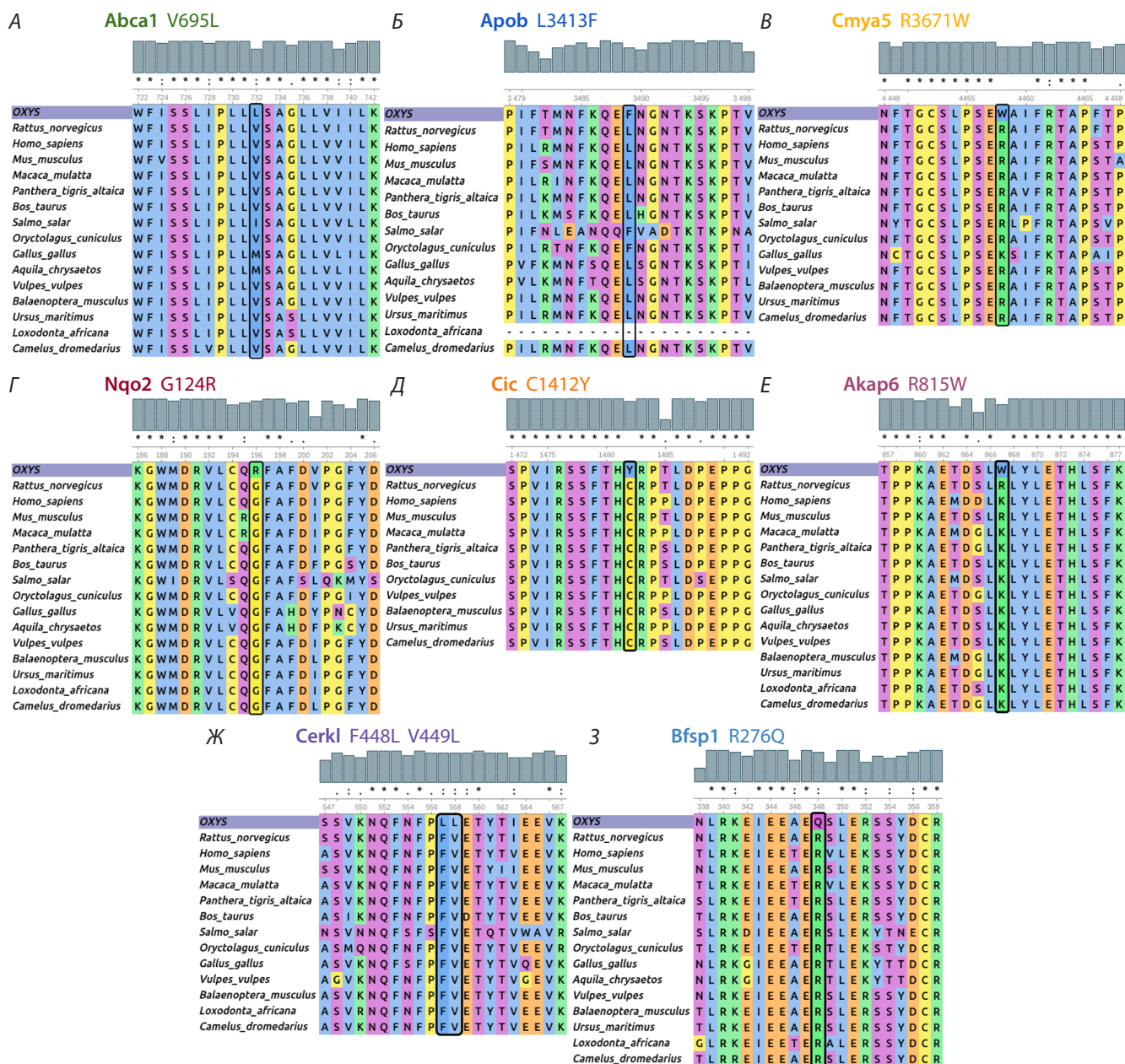
занные как повреждающие алгоритмом SIFT, – 423 варианта. В результате сопоставления генотипов OHB и инделов крыс OXYS с генотипами 146 линий крыс (см. Список S1 в Приложении) из базы данных Rat Genome Database (de la Cruz et al., 2004) были выделены 33 варианта, приводящих к функционально значимым нарушениям, и 87 повреждающих миссенс-вариантов, отсутствующих у всех линий, кроме OXYS.

Из полученного списка уникальных для крыс OXYS генетических вариантов проводился отбор вариантов в генах, вовлеченных в ключевые метаболические пути старения и связанные с возрастом патологии: митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс, нейродегенерацию, когнитивные и зрительные нарушения, саркопению и расстройства липидного обмена. Каждый кандидатный вариант был верифицирован путем визуальной проверки выравниваний в IGV и анализа эволюционной консервативности затронутых аминокислотных позиций. Варианты в регионах с низким качеством картирования, артефактами выравнивания или низкой степенью консервативности были исключены из дальнейшего рассмотрения. В результате были отобраны гены-кандидаты: *Abca1*, *Apob*, *Cic*, *Nqo2*, *Akar6*, *Cmya5*, *Cerkl*, *Bfsp1*, функциональные нарушения которых могут лежать в основе формирования у крыс OXYS фенотипа преждевременного старения. Найденные в генах-кандидатах варианты описаны в табл. 1, визуализированы в IGV (рис. S1) и показаны на схеме транскриптов (рис. S2).

**Расстройства липидного обмена.** Гены *Apob* и *Abca1* связаны с липидным метаболизмом. *Abca1* экспрессируется преимущественно в жировой ткани и печени крыс, а также в различных типах иммунных клеток (Wu et al.,

**Таблица 1.** Уникальные для крыс OXYS миссенс-варианты в генах-кандидатах с генотипами всех анализируемых образцов (0 – референсный аллель, 1 – альтернативный)

| Геномные координаты | Референсный аллель | Альтернативный аллель | Ген          | Замена в транскрипте             | Аминокислотная замена              | OXYS 17 | OXYS 30 | OXYS 34 | Wistar 5 | Wistar 22 | Wistar 37 |
|---------------------|--------------------|-----------------------|--------------|----------------------------------|------------------------------------|---------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
| 1:80,874,547        | G                  | A                     | <i>Cic</i>   | ENSRNOT00000101741.1:c.4235G>A   | ENSRNOP000000094181.1:p.Cys1412Tyr | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 2:24,306,965        | T                  | A                     | <i>Cmya5</i> | ENSRNOT00000073710.4:c.11011A>T  | ENSRNOP000000064514.2:p.Arg3671Trp | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/1       | 0/1       |
| 3:64,239,860        | C                  | A                     | <i>Cerkl</i> | ENSRNOT000000057878.6:c.1345G>T  | ENSRNOP000000054687.5:p.Val449Leu  | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 3:64,239,861        | A                  | C                     | <i>Cerkl</i> | ENSRNOT000000057878.6:c.1344T>G  | ENSRNOP000000054687.5:p.Phe448Leu  | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 3:131,199,280       | C                  | T                     | <i>Bfsp1</i> | ENSRNOT00000007727.6:c.827G>A    | ENSRNOP00000007727.4:p.Arg276Gln   | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/1       | 0/0       |
| 5:67,724,612        | C                  | G                     | <i>Abca1</i> | ENSRNOT00000110113.1:c.2083G>C   | ENSRNOP000000078596.1:p.Val695Leu  | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 6:30,878,853        | C                  | T                     | <i>Apob</i>  | ENSRNOT000000046811.5:c.10237C>T | ENSRNOP000000039779.2:p.Leu3413Phe | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 6:70,399,863        | C                  | T                     | <i>Akar6</i> | ENSRNOT00000006562.4:c.2443C>T   | ENSRNOP00000006562.2:p.Arg815Trp   | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 17:30,913,758       | C                  | T                     | <i>Nqo2</i>  | ENSRNOT000000024141.6:c.370G>A   | ENSRNOP000000024141.5:p.Gly124Arg  | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |



**Рис. 3.** Аминокислотные (АК) замены в белках OXYS крыс (сверху на каждой картинке) и гомологичная позиция (выделена черной рамкой) у ортологичных белков разных видов животных (норвежская крыса – *Rattus\_norvegicus*, человек разумный – *Homo\_sapiens*, домовая мышь – *Mus\_musculus*, макак-резус – *Macaca\_mulatta*, амурский тигр – *Panthera\_tigris\_altaica*, домашний бык – *Bos\_taurus*, атлантический лосось – *Salmo\_salar*, дикий кролик – *Oryctolagus\_cuniculus*, банкинский петух – *Gallus\_gallus*, беркут – *Aquila\_chrysaetos*, рыжая лисица – *Vulpes\_vulpes*, синий кит – *Balaenoptera\_musculus*, белый медведь – *Ursus\_maritimus*, саванный слон – *Loxodonta\_africana*, одногорбый верблюд – *Camelus\_dromedarius*).

Полярные незаряженные АК обозначены фиолетовым цветом (S, T, N, Q), гидрофобные – голубым (A, V, I, L, M, F, Y, W), положительно заряженные – зеленым (R, H, K), отрицательно – оранжевым (D, E), другие – желтым (C, G, P). Над АК последовательностями в виде столбцов расположен трек консервативности (высота столбца соответствует степени эволюционной консервативности АК). Изображения получены в программе UGENE 45.0 (Okonechnikov et al., 2012).

2009; RatGTEx Consortium, 2021). Продукт гена *Abca1* играет ключевую роль в процессе транспортировки холестерина и фосфолипидов через клеточную мембрану, важном для формирования липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в печени (Oram, 2003; Ghanbari-Niaki et al., 2007). Аминокислотная замена V695L находится в одном из трансмембранных доменов *Abca1*, обогащенном

гидрофобными аминокислотными остатками (рис. 3, A и рис. S3). Валин (V) в гомологичной позиции присутствует у большинства его ортологов среди плацентарных млекопитающих и грызунов, тем не менее у одного животного, арктического суслика (*Urociellus parryi*), обнаружен лейцин (L) (рис. S4, A). В этом положении могут находиться и другие гидрофобные аминокислоты: метионин (M) у птиц

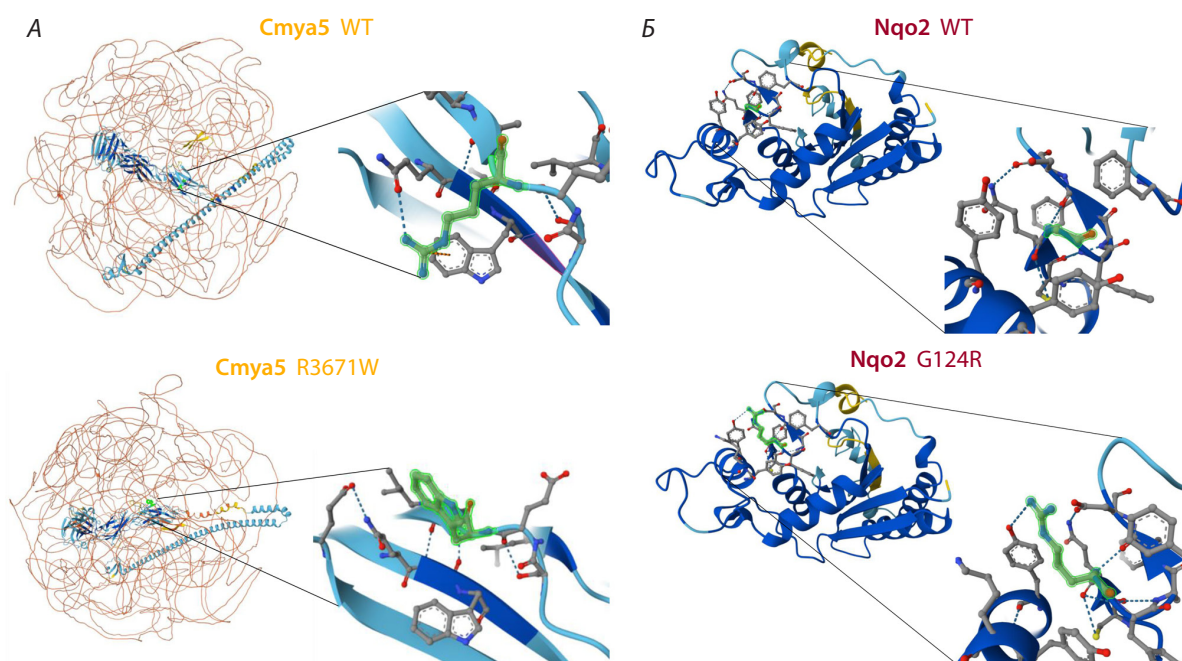


(банкинский петух *Gallus gallus*, беркут *Aquila chrysaetos*) и изолейцин (I) у рыбы (атлантический лосось *Salmo salar*) (см. рис. 3, А). Abca1 имеет 15 древних паралогов, которые в гомологичной позиции кроме валина (V) содержат и другие гидрофобные аминокислоты: изолейцин (I), аланин (A), метионин (M) и лейцин (L) (рис. S5). В совокупности эти данные указывают на то, что замена V695L, вероятно, совместима с сохранением структурной целостности и функции белка.

Ген *ApoB* кодирует две изоформы аполипопротеина В: ApoB-100 – структурный белок липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), синтезируемый в печени, и ApoB-48 – компонент хиломикрон, липопротеиновых частиц клеток тонкого кишечника. ApoB-100 участвует в синтезе и секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) – предшественников ЛПНП, необходимых для транспорта эндогенных триглицеридов и холестерина в кровь (Davidson, Shelness, 2000). Кроме того, ApoB-100 служит лигандом для рецепторов ЛПНП на гепатоцитах, опосредуя захват и клиренс ApoB-содержащих частиц печенью (Davidson, Shelness, 2000). У гена *ApoB* отсутствуют паралоги. Обнаруженная аминокислотная замена L3413F расположена в гепарин-связывающем домене ApoB-100, который опосредует связывание частиц ЛПНП с протеогликами внеклеточного матрикса, богатыми гликозаминогликанами (Flood et al., 2004) (см. рис. 3, В и рис. S6). У большинства грызунов и млекопитающих в гомологичном положении находится лейцин (L), однако у

дикого кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и атлантического лосося (*S. salar*) в гомологичной позиции расположен фенилаланин (F) (см. рис. 3, В и рис. S4, В). Поскольку обе аминокислоты являются гидрофобными, а фенилаланин встречается в гомологичной позиции у эволюционно отдаленных видов без потери жизнеспособности, можно заключить, что замена L3413F не приводит к существенному нарушению функции белка. Тем не менее, учитывая, что фенилаланин обладает объемным ароматическим боковым радикалом, нельзя полностью исключить потенциальное влияние замены на локальную конформацию домена или эффективность взаимодействия с протеогликами внеклеточного матрикса. Таким образом, данная замена, вероятно, относится к вариантам с низким функциональным воздействием.

**Дисфункции скелетной и сердечной мышц.** Ген *Cmya5* кодирует крупный белок, который высоко экспрессирован в скелетных мышцах и сердце и участвует в структурной организации саркомеров в кардиомиоцитах и волокнах скелетной мускулатуры (Wu et al., 2009; Lu et al., 2022). Найденная в нем миссенс-замена приводит к R3671W в первом домене фибронектина типа III (Fibronectin type-III 1, FN3-1), который участвует во взаимодействии с М-доменами титина в М-линии саркомеров (Sarparanta, 2008; Sarparanta et al., 2010) (см. рис. 3, В и рис. 4, А). Аргинин (R) в этой позиции достаточно консервативен как среди эволюционно отдаленных видов животных (только у банкинского петуха *G. gallus* встречается



**Рис. 4.** Структуры белков, предсказанные с помощью AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024). А – *Cmya5* (исходная – WT (3671R) и с заменой у крыс OXYS – R3671W). Участок FN3-1 домена, в котором локализована замена, приближен. Аминокислота в положении 3671 подсвечена зеленым. Б – *Nqo2* (исходная – WT (124G) и с заменой у крыс OXYS – G124R). Участок локализации замены приближен. Аминокислота в положении 124 подсвечена зеленым.

Цветовая кодировка отражает локальную надежность предсказания структуры (pLDDT): синий (90–100) – очень высокая, голубой (70–89) – высокая, желтый (50–69) – низкая, оранжевый (<50) – очень низкая. Участки с pLDDT < 50, вероятно, представляют собой неупорядоченные регионы белка.



лизин (К), который, как и аргинин, несет положительный заряд), так и среди грызунов (см. рис. 3, В и рис. S4, В). *Сmya5* имеет три эволюционно древних паралога: *Fsd1*, *Fsd2* и *Fsd11*, один из которых – *Fsd2*, экспрессируется в мышечной ткани, однако выполняет иные функции. Замена положительно заряженного аргинина на гидрофобный ароматический триптофан в положении 3671 (R3671W), локализованная в  $\beta$ -складчатой структуре FN3-1 домена *Сmya5*, нарушает взаимодействия с соседними аминокислотами и может повлиять на упаковку домена и тем самым на взаимодействие с другими белками, в частности с титином (см. рис. 4, А).

**Нейродегенерация и когнитивный дефицит.** Ген *Nqo2* кодирует флавин-зависимый белок *Nqo2*, который структурно гомологичен хинон дегидрогеназе *Nqo1*, но существенно отличается по кофакторной специфичности: *Nqo2* крайне неэффективно связывается с физиологическими кофакторами НАД(Ф)Н и, вероятно, выполняет преимущественно регуляторную, а не каталитическую функцию (Islam, Shilton, 2025). *Nqo2* высоко экспрессируется в почках и печени (Wu et al., 2009; RatGTEx Consortium, 2021). Обнаруженный у крыс OXYS миссенс-вариант в *Nqo2* приводит к замене G124R в высококонсервативном положении белка как среди эволюционно далеких животных, так и среди грызунов и родственных им видов (см. рис. 3, Г и рис. S4, Г). Данная замена локализована вблизи субстрат-связывающего сайта 127–129 FDV (фенилаланин-аспарагиновая кислота-валин) (см. рис. 4, Б). *Nqo2* имеет два паралога: предсказанный ген *AABR07044714*, который возник у крыс, и эволюционно более древний *Nqo1*, кодирующий фермент с функцией восстановления хинонов. Замена глицина на крупный положительно заряженный аргинин нарушает локальные взаимодействия внутри белка и может повлиять на белок-белковые взаимодействия, сродство к лигандам или редокс-зависимую регуляторную функцию *Nqo2* (см. рис. 4, Б).

Ген *Cic* кодирует транскрипционный репрессор *Capicua*, его экспрессия наиболее высока в нервной ткани (RatGTEx Consortium, 2021). Он играет важную роль в нейрогенезе и выступает как супрессор для различных видов опухолей (Wong, Yip, 2020; Hourigan et al., 2021). Найденная у крыс OXYS замена C1412Y находится в высококонсервативной области белка, которая, однако, не организована в упорядоченный домен и предсказана с низкой надежностью ( $pLDDT < 50$ ) (см. рис. 3, Д и рис. S7). У всех анализируемых ортологов в гомологичном положении присутствует цистеин (С) (см. рис. 3, Д и рис. S4, Д). *Cic* имеет всего один древний паралог, *Bbx*, который выполняет иные функции и не содержит гомологичного региона. Поскольку замена цистеина на тирозин в позиции 1412 (C1412Y) расположена в высококонсервативной области белка, а функциональная компенсация со стороны паралога *Bbx* невозможна, данный вариант способен повлиять на функциональную активность белка *Cic*, несмотря на локализацию в структурно неупорядоченном регионе.

Ген *Akar6* кодирует адаптерный белок, закрепляющий сигнальные комплексы в ядерной оболочке и саркоплазм-

матическом ретикулуме (Dodge-Kafka et al., 2005; Vergarajaregui et al., 2020). У крыс он экспрессируется преимущественно в сердце, скелетной мускулатуре и головном мозге, включая гиппокамп и кору больших полушарий (Wu et al., 2009; RatGTEx Consortium, 2021). Обнаруженная замена аргинина на триптофан в положении 815 (R815W) расположена в пределах первого спектринового повтора (Spectrin 1, SR1) – домена, критичного для белок-белковых взаимодействий (Vergarajaregui et al., 2020) (см. рис. 3, Е и рис. S8). *Akar6* имеет один паралог – *Ser68*, который не содержит гомологичного региона и не выполняет похожих адаптерных функций. Анализ множественного выравнивания ортологов показывает, что позиция 815 строго консервативна по заряду: у всех исследуемых видов животных в гомологичной позиции присутствует либо аргинин (R), либо лизин (К) – положительно заряженные аминокислотные остатки (см. рис. 3, Е и рис. S4, Е). Таким образом, замена R815W является неконсервативной: аргинин (положительно заряженная полярная аминокислота) заменяется на триптофан (крупный гидрофобный остаток с ароматическим кольцом), что может привести к нарушению белок-белковых взаимодействий через SR1 домен.

**Зрительные нарушения.** Ген *Cerkl* участвует в регуляции аутофагии, динамики митохондрий и метаболизма, а также играет важную роль в защите фоторецепторов и клеток пигментного эпителия сетчатки (РПЭ) от окислительного стресса и апоптоза (Mirra et al., 2021). Выявленные у крыс OXYS в *Cerkl* две идущие подряд аминокислотные замены F448L и V449L локализуются в неупорядоченной С-концевой области белка, обогащенной гидрофобными аминокислотными остатками (см. рис. 3, Ж, рис. S9). Фенилаланин (F) в положении 448 консервативен среди всех анализируемых ортологов (см. рис. 3, Ж и рис. S4, Ж), однако валин (V) в положении 449 допускает замену на другую гидрофобную аминокислоту у грызунов – изолейцин (I) (см. рис. S4, Ж). *Cerkl* имеет четыре эволюционно древних паралога (*Cerk*, *Sphk1*, *Sphk2*, *Agk*), которые, в отличие от *Cerkl*, сохранили липид-киназную активность и реализуют иные регуляторные механизмы. Несмотря на это, обе найденные замены расположены в области, обогащенной гидрофобными аминокислотными остатками, поэтому их эффект на структуру и функции белка *Cerkl* может быть минимален.

В гене *Bfsp1*, кодирующем структурный белок промежуточных филаментов хрусталика, идентифицирована миссенс-замена, ведущая к R276Q в одном из  $\alpha$ -спиральных доменов стержневой области (см. рис. 3, З, рис. S10). Эта область обеспечивает полимеризацию филаментов и их взаимодействие с *Bfsp2* для формирования цитоскелета волокон хрусталика (Perng et al., 2007). Аминокислота аргинин (R) в положении 276 достаточно консервативна среди анализируемых ортологов, но у одного вида – китайского хомячка (*Cricetulus griseus*) – в гомологичной позиции локализован триптофан (W) (см. рис. 3, З и рис. S4, З). Ген *Bfsp1* не имеет паралогов, что свидетельствует об уникальности его функции. Несмотря на сохраненную структуру белка, потеря положительного заряда в результате замены

аргинина на глутамин в центре одного из доменов стержневой области может привести к нарушению сборки промежуточных филаментов в хрусталике.

Визуализация тканеспецифичной экспрессии у крыс каждого из вышеперечисленных генов представлена на рис. S11–S18).

**Митохондриальная дисфункция.** Считается, что фенотип преждевременного старения у крыс OXYS связан с дисфункцией митохондрий (Tyumentsev et al., 2018). В связи с этим из списка миссенс-замен и вариантов, приводящих к функционально значимым нарушениям и отличающих крыс OXYS от Wistar/Icgn, были отобраны варианты в генах, связанных с митохондриальными функциями. В генах *Mrps30*, *Decr1*, *Mecr*, *Ptcd1* и *Afg3l1* у крыс OXYS обнаружены миссенс-замены, предсказанные как повреждающие алгоритмом SIFT (табл. S4). Анализ распространенности этих генетических вариантов среди 146 линий крыс (список S1 в Приложении) показал, что они встречаются с высокой частотой среди других, в том числе здоровых, линий (табл. S5), поэтому, вероятно, не вносят существенного вклада в развитие у крыс OXYS структурно-функциональных нарушений митохондрий.

Анализ вариаций числа копий геномных регионов (CNV)

Для повышения точности поиска и определения границ CNV применялись две программы, использующие разные подходы: CNVpytor – поиск по глубине прочтения, Smoove – по расщепленным и дискордантным парным

прочтениям. Большинство CNV, отличающих крыс OXYS от контрольной группы крыс Wistar/Icgn, найдено в некодирующих областях генома: межгенных регионах и интронах генов. После отбора функционально значимых категорий CNV (попадающих в кодирующие регионы и пересекающихся с регуляторными областями) все кандидаты относились к классу делеций. Структурные вариации других типов в функционально значимых регионах выявлены не были.

**CNV в кодирующих регионах.** В генах *LOC100911093*, *Ybx1l1*, *Gsta6* и *Mettl24* делеции у крыс OXYS затрагивают кодирующие области – экзоны (табл. 2). При этом гены *LOC100911093* и *Ybx1l1* полностью делетированы (рис. 5). *LOC100911093* предположительно кодирует митохондриальную ССА-тРНК-нуклеотидилтрансферазу и имеет один паралог, *Trnt1*, на уровне крысы (гомология 99.54 %), который выполняет ту же функцию как в цитоплазме, так и в митохондриях. *Ybx1l1* может связываться с нуклеиновыми кислотами, участвуя в регуляции экспрессии генов. *Ybx1l1* имеет шесть паралогов, один из которых, *Ybx1*, имеет высокую гомологию (94.48 %) с *Ybx1l1*. Человеческий ортолог, *YBX1*, участвует в репарации ДНК при окислительном стрессе (Zheng et al., 2025). Оба гена (*LOC100911093* и *Ybx1l1*) недостаточно изучены на модели крысы, что затрудняет оценку функциональных последствий их утраты, а наличие высокоомологичных паралогов (*Trnt1* и *Ybx1*) предполагает возможность частичной функциональной компенсации.

Таблица 2. Делеции, затрагивающие кодирующие участки генов – экзоны, и генотипы всех образцов (0 – референсный аллель, 1 – делеция)

| Координаты                | Длина, п. н. | Ген                 | OXYS 17 | OXYS 30 | OXYS 34 | Wistar 5 | Wistar 22 | Wistar 37 |
|---------------------------|--------------|---------------------|---------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
| 1:170,720,408–170,722,750 | 2342         | <i>LOC100911093</i> | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/1       | 0/1       |
| 1:171,304,588–171,306,097 | 1509         | <i>Ybx1l1</i>       | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/1       | 0/1       |
| 9:23,797,233–23,803,955   | 6722         | <i>Gsta6</i>        | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/1       |
| 20:44,142,209–44,146,664  | 4455         | <i>Mettl24</i>      | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |

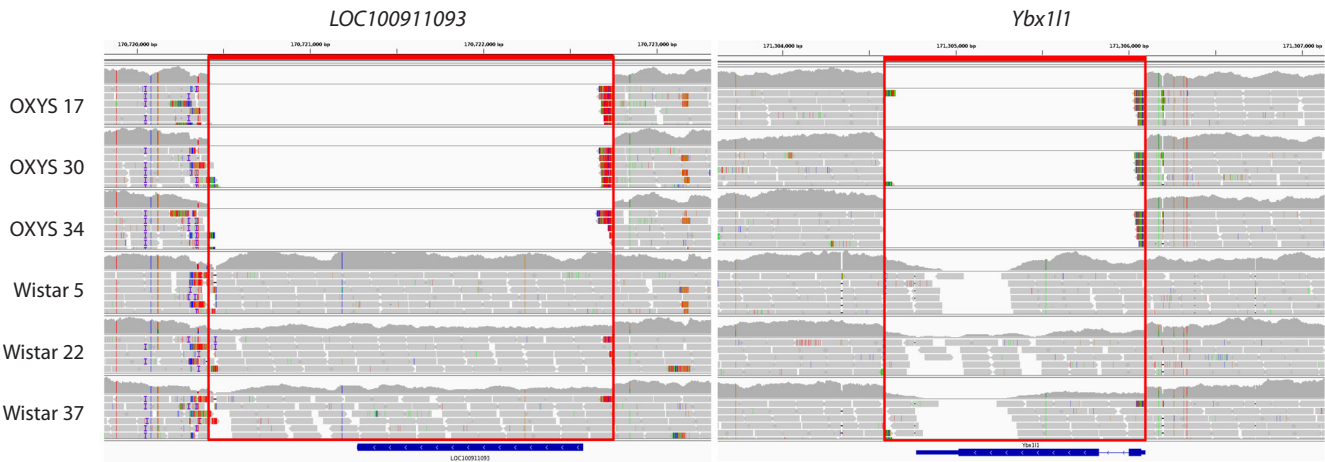


Рис. 5. Делетированные гены *LOC100911093* и *Ybx1l1* в геномах крыс OXYS. Масштаб 3500 п.н. Красными рамками обозначены границы делеций. Изображения получены в IGV (Robinson et al., 2011).

У генов *Gsta6* и *Mettl24* первый экзон попадает в область делеции. *Gsta6* принадлежит к семейству альфа глутатион-S-трансфераз и участвует в метаболизме одного из антиоксидантов – глутатиона, который играет важную роль в нейтрализации свободных радикалов и поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза (Forman et al., 2009). Этот ген на данный момент малоизучен и имеет 19 паралогов, пять из которых тоже относятся к семейству альфа глутатион-S-трансфераз, что может обеспечить частичную компенсацию функции *Gsta6*. *Mettl24* кодирует фермент с предсказанной метилтрансферазной активностью, однако на модели крыс он изучен слабо. Его ортолог, *METTL24*, у человека связан с иммунными функциями и ассоциирован с раком почки (KIRC) (Jiang et al., 2022). Ген *Mettl24* имеет два древних паралога (*Scara3* и *Cthrc1*) с низким уровнем гомологии (7.76 и 16.97 % соответственно), которые не относятся к метилтрансферазам.

**CNV в регуляторных областях генома.** H3K27Ac – эпигенетическая модификация (ацетилирование) 27-го лизина на N-концевом участке ДНК-упаковывающего белка, гистона H3. Обогащение геномного региона данной эпигенетической меткой сигнализирует о расположении в нем активных регуляторных элементов: промоторов и энхансеров. Показано, что развитие признаков БА у крыс OXYS, как и у людей, связано с нейродегенеративными изменениями прежде всего в гиппокампе и префронтальной коре (Stefanova et al., 2014). В связи с этим мы решили проверить, попадают ли найденные в геномах крыс OXYS CNV в участки активных регуляторных элементов тканей вентрального и дорсального гиппокампа и префронтальной коры.

На основе ChIP-seq данных участков мозга контрольной группы крыс аутбредной линии Long-Evans (Rayan et al., 2022) были получены координаты пиков обогащения по гистоновой метке H3K27Ac, которые соотнесли с координатами уникальных для крыс OXYS CNV. Делеции в генах *Gsta6*, *Mettl24*, *Fat1*, *Babam2* и перед 5'-концом гена *Abcf1* затрагивают участки, обогащенные H3K27Ac метками (табл. 3, рис. 6). Делеции в генах *Gsta6* и *Mettl24*, описанных выше, локализованы в их предполагаемой промоторной области и затрагивают первый экзон. Делеции в *Fat1* и *Babam2* расположены в их интронах и, вероятно, затрагивают активные энхансеры. Ген *Fat1* кодирует белок из семейства атипичных кадгеринов, который участвует в межклеточной адгезии, развитии мышц и нейронов, а также в положительной регуляции миграции различных клеток: нейронов, фибробластов, астроцитарных предшественников и гладкомышечных клеток в сосудах (Riascos-Bernal et al., 2023; Helmbacher, 2018). У *Fat1* имеется семь паралогов, три из которых тоже относятся к семейству атипичных кадгеринов. Ген *Babam2* кодирует адаптерный белок, входящий в состав комплексов BRCA1-A и BRISC. Он играет важную роль в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, поддержании клеточного цикла и предотвращении клеточного старения (Chung et al., 2020), а также ингибирует митохондриальный путь апоптоза (Li Q. et al., 2004). Отсутствие паралогов у гена *Babam2* исключает возможность генетической компенсации при потенци-

альном нарушении его регуляции, вызванном делецией в энхансерной области. Делеция перед 5'-концом гена *Abcf1* может затрагивать его активный промотор. Продукт гена *Abcf1* относится к суперсемейству АТФ-связывающих каскадных ABC белков, участвует в инициации и элонгации трансляции и регулирует врожденный иммунный ответ (Wilcox et al., 2017). Оба паралога *Abcf1* принадлежат к тому же подсемейству ABC белков F.

В результате проведенного анализа показано, что обнаруженные у крыс OXYS делеции приводят к исключению регуляторных областей генов. Наибольшие повреждения могут иметь гены *Gsta6* и *Mettl24*, в которых делеции расположены в наиболее богатых H3K27Ac регионах, соответствующих активным промоторам генов.

Визуализация тканеспецифичной экспрессии у крыс каждого из вышеперечисленных генов представлена на рис. S19–S25.

## Обсуждение

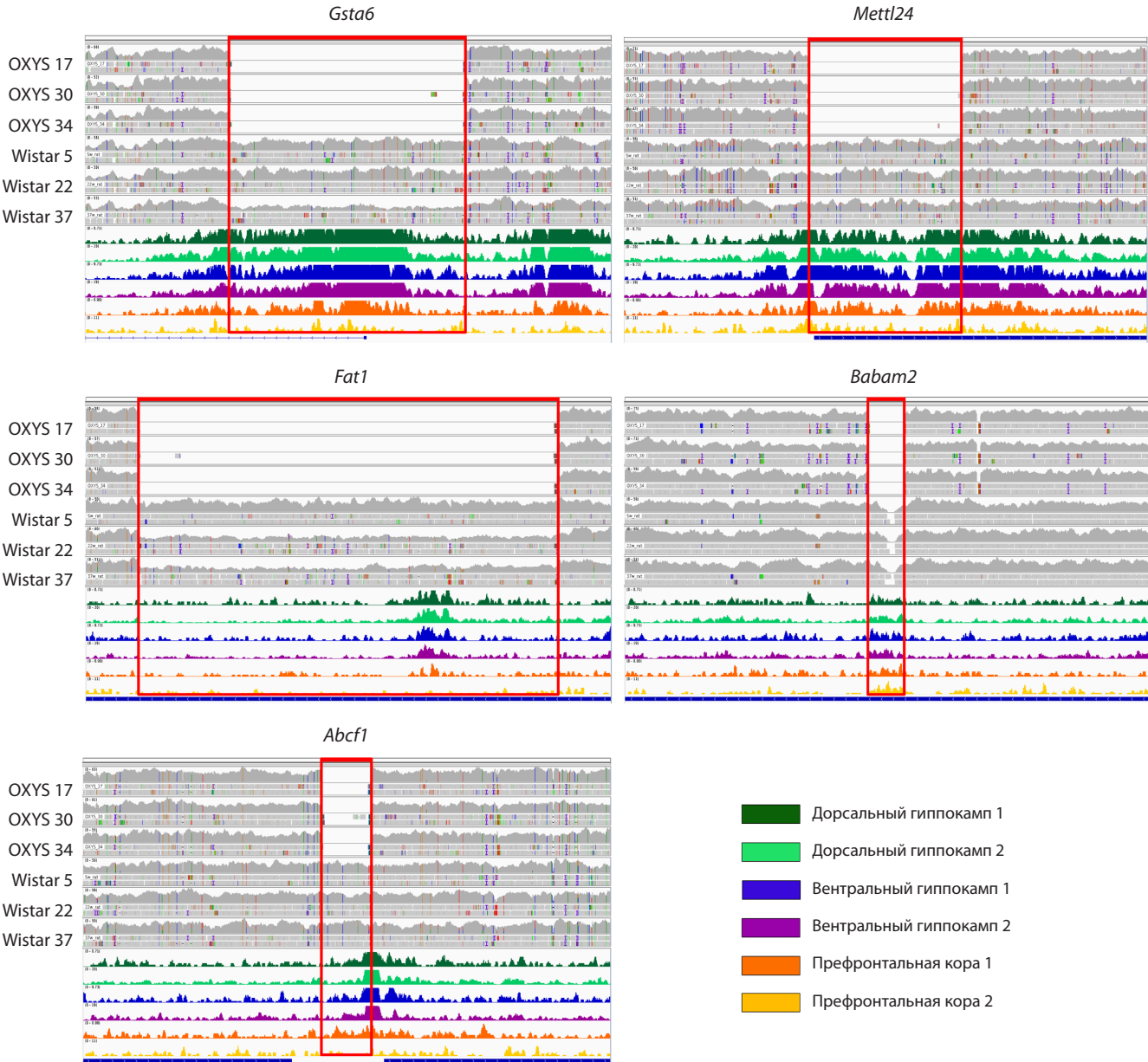
Целью данного исследования было идентифицировать у крыс линии OXYS генетические варианты, которые могут способствовать проявлению у них фенотипа преждевременного старения, сопровождающегося развитием различных возраст-ассоциированных патологий.

## Когнитивные нарушения и нейродегенерация

С обнаруженными в генах *Fat1*, *Cic*, *Akap6*, *Gsta6*, *Nqo2* вариантами может быть связано раннее развитие у крыс OXYS нейродегенеративных изменений и снижение когнитивных функций. Так, в некодирующем регионе гена *Fat1* обнаружена крупная делеция, вероятно, затрагивающая активный энхансер. У позвоночных, включая крыс, ген *Fat1* экспрессируется в развивающемся и взрослом мозге: уровень экспрессии особенно высок в областях, участвующих в нейрогенезе (Ahmed et al., 2015; Peng et al., 2021). Его продукт FAT1 вовлечен в ранние стадии дифференцировки нейронов, контролирует рост аксонов через сигнальный путь Hippo и способствует терминальной дифференцировке клеток, ингибируя их пролиферацию (Peng et al., 2021). Таким образом, найденная делеция может снижать экспрессию *Fat1* в зонах нейрогенеза в гиппокампе, нарушая регуляцию синаптической пластичности и миграции нейронов, усугубляя когнитивный дефицит у крыс OXYS.

Белок CIC (Carcicua) – ключевой эффектор сигнального пути RTK/RAS/MAPK, регулирующий баланс пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников в гиппокампе (Hourigan et al., 2021). Он также выступает супрессором опухолей, репрессируя транскрипцию онкогенов семейства ETS (Wong, Yip, 2020), и образует комплекс с белком Ataxin-1, который ассоциирован с развитием нейродегенеративной патологии – спиноцереbellарной атаксии 1-го типа (SCA1) (Rousseaux et al., 2018). Патогенные варианты в *CIC* описаны в олигодендроглиомах человека, где его инактивация стимулирует пролиферацию глиальных клеток через активацию онкогенов *ETV1/4/5* (Yip et al., 2012). Утрата репрессорной функции CIC в гиппокампе мышей приводит к сокращению пула





**Рис. 6.** Делеции в генах *Gsta6*, *Mettl24*, *Fat1*, *Babam2* и *Abcf1*, попадающие на участки обогащения гистоновой метки H3K27Ac в тканях префронтальной коры, дорсального и вентрального гиппокампа *Rattus norvegicus*. Масштаб 15 т.п.н. Красными рамками обозначены границы делеций. Изображения получены в IGV (Robinson et al., 2011).

**Таблица 3.** Делеции, затрагивающие пики обогащения гистоновой метки H3K27Ac в тканях префронтальной коры, дорсального и вентрального гиппокампа *Rattus norvegicus*, и генотипы всех анализируемых образцов (0 – референсный аллель, 1 – делеция)

| Координаты               | Длина, п.н. | Ген            | OXYS 17 | OXYS 30 | OXYS 34 | Wistar 5 | Wistar 22 | Wistar 37 |
|--------------------------|-------------|----------------|---------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
| 9:23,797,233–23,803,955  | 6722        | <i>Gsta6</i>   | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/1       |
| 20:44,142,209–44,146,664 | 4455        | <i>Mettl24</i> | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 16:47,224,153–47,236,087 | 11934       | <i>Fat1</i>    | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/1       | 0/1       |
| 6:24,707,559–24,708,619  | 1060        | <i>Babam2</i>  | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |
| 20:2,800,714–2,802,114   | 1400        | <i>Abcf1</i>   | 1/1     | 1/1     | 1/1     | 0/0      | 0/0       | 0/0       |



нейрональных предшественников и препятствует их дифференцировке, а также нарушает миграцию нейронов и созревание их дендритных отростков (Hourigan et al., 2021). Можно предположить, что найденный у крыс OXYS миссенс-вариант *Cic* вносит вклад в выявленную у них задержку созревания мозга в ранний постнатальный период, связанную с изменением баланса пролиферации и дифференцировки нейронных предшественников (Rudnitskaya et al., 2020).

Замена R815W в SR1 домене Акaр6 ранее была описана в исследовании ОНВ на транскриптомных данных гиппокампа и префронтальной коры крыс OXYS как связанная с когнитивными нарушениями (Devyatkin et al., 2020b). Спектриновые повторы АКАР6 участвуют в связывании с белками ядерной оболочки (несприн-1 $\alpha$ ) и компонентами центра организации микротрубочек (перичесентрин, АКАР9) и обеспечивают якорение сигнальных молекул, таких как кальциневрин и NFATc4 (Mackiewicz et al., 2024). Нарушение структурной целостности спектриновых повторов АКАР6 способно дестабилизировать его закрепление на ядерной оболочке и организацию перинуклеарных сигнальных комплексов, что может ослабить передачу провыживательных сигналов от BDNF-рецепторов к транскрипционным мишеням (например, через путь кальциневрин-NFATc4), повышая уязвимость нейронов к стрессу и дегенерации (Mackiewicz et al., 2024). Недавние работы продемонстрировали, что АКАР6 играет ключевую роль в нейротрофин-опосредованном выживании ганглиозных клеток сетчатки (Tomczak et al., 2024). Кроме того, исследования полногеномных ассоциаций связывают полиморфизмы в локусе *AKAP6* с нарушениями эпизодической памяти, скорости восприятия и других когнитивных функций у пожилых людей (Andrews et al., 2017). Расположение R815W в функционально значимом домене SR1 и эволюционная сохранность положительного заряда в гомологичном положении у ортологов Акaр6 позволяют предположить, что данный вариант способен внести вклад в формирование когнитивного дефицита у крыс OXYS.

Снижение по сравнению с контрольными крысами Wistar/Исгн уровня экспрессии гена *Gstab* из семейства альфа глутатион-S-трансфераз, обнаруженное в префронтальной коре, гиппокампе и сетчатке OXYS крыс в период постнатального завершения развития их мозга (Telegina et al., 2015; Stefanova, Kolosova, 2023), вероятно, вызвано найденной делецией в предполагаемом активном промоторе этого гена. Снижение экспрессии *Gstab* может ослаблять глутатион-зависимую нейтрализацию свободных радикалов, способствуя снижению антиоксидантной защиты нейронов и фоторецепторов.

Миссенс-замена в гене *Nqo2* ранее была описана в исследовании ОНВ на транскриптомных данных гиппокампа и префронтальной коры крыс OXYS и охарактеризована как потенциально связанная с нейродегенерацией и развитием БА (Devyatkin et al., 2020b). Экспрессия *NQO2* в мозге регистрируется в структурах, критически важных для когнитивных функций (включая гиппокамп и кору), и повышается с возрастом и при развитии БА (Janda et al., 2024). Роль *NQO2* в процессах обучения и консолидации

памяти предположительно связана с его влиянием на клеточный метаболизм и продукцию АФК, в том числе митохондриального происхождения (Islam, Shilton, 2025). Данные свидетельствуют также о вовлеченности *NQO2* в регуляцию окислительного стресса, воспаления, аутофагии и апоптоза и о его способности взаимодействовать с рядом биоактивных соединений, включая некоторые противоопухолевые препараты (Janda et al., 2024; Islam, Shilton, 2025). Таким образом, найденные генетические варианты в *Gstab* и *Nqo2* могут способствовать развитию ранних нейродегенеративных изменений в структурах мозга и сетчатке крыс OXYS – признаков болезни Альцгеймера и возрастной макулярной дегенерации.

Ранее было продемонстрировано, что во фронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS наблюдается повышенный уровень окислительных повреждений ДНК (8-оксогуанин) по сравнению с родительской линией Wistar/Исгн (Sattarova et al., 2013). Выявленная в регуляторной области *Babam2* делеция представляет интерес как потенциальный фактор геномной нестабильности. Хотя прямых данных о накоплении двуцепочечных разрывов у крыс OXYS нет, снижение экспрессии генов репарации может усугублять последствия окислительных повреждений в мозге. Важно отметить, что антиапоптотическая функция *BABAM2* реализуется через ингибирование митохондриального каскада апоптоза (Li Q. et al., 2004). Учитывая, что митохондриальная дисфункция и нарушение регуляции апоптоза – ранние признаки у крыс OXYS (Stefanova et al., 2014), снижение экспрессии *Babam2* в гиппокампе и префронтальной коре вследствие обнаруженной делеции в его энхансере может повышать чувствительность нейронов к стресс-индуцированной гибели.

#### Офтальмологические патологии (ретинопатия и катаракта)

Клинические проявления ретинопатии, аналогичной сухой форме возрастной макулярной дегенерации у людей, манифестируют у крыс OXYS к возрасту 3–4 месяцев на фоне структурно-функциональных изменений клеток РПЭ и нарушения микроциркуляции в хориоидее (Markovets et al., 2010). Патологические изменения сетчатки прогрессируют на фоне усиленного накопления бета-амилоида и липофусцина в клетках пигментного эпителия, нарушения их морфологии и реактивного глиоза и к возрасту 24 месяцев приводят к полной потере фоторецепторов (Markovets et al., 2010; Zhdankina et al., 2023). Некоторые из обнаруженных в исследовании генетических вариантов потенциально способны повлиять на развитие этой патологии. В их числе делеция в предполагаемой промоторной области гена *Abcb1*, который играет решающую роль в гомеостазе сетчатки, регулируя фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов клетками РПЭ (Guo et al., 2015). Обнаруженная делеция может понизить его экспрессию и таким образом внести вклад в развитие признаков ВМД у OXYS крыс.

Ген *Cerkl* – ключевой протектор фоторецепторов и клеток РПЭ от окислительного стресса и апоптоза (Mirra et al., 2021). Он экспрессируется преимущественно в мозжечке, гиппокампе, коре головного мозга и сетчатке, в функцио-

нировании которой играет решающую роль (García-Arroyo et al., 2021, 2022). Мутации в *CERKL* вызывают дистрофии сетчатки, характеризующиеся прогрессирующей дегенерацией ее нейронов, которая в конечном итоге приводит к потере зрения (Tuson et al., 2004; Aleman et al., 2009; Sen et al., 2020). Две последовательные замены F448L и V449L в С-концевом регионе белка *Cerkl*, вероятно, не вызывают значимых нарушений его функции, поскольку имеют консервативный характер (гидрофобные аминокислоты замещаются на гидрофобные); тем не менее их потенциальная роль в развитии ранних нейродегенеративных изменений сетчатки у крыс OXYS не может быть полностью исключена.

Замена R276Q в *Bfsp1* может ускорить дегенерацию хрусталика за счет снижения механической устойчивости промежуточных филаментов его волокон. С нарушением функций *BFS1* связано развитие сенильной катаракты у человека (Song et al., 2009). ОНВ с потерей заряда аминокислоты (D348N) описан как причина развития врожденной катаракты у человека (Wang et al., 2023). У *Bfsp1*-нокаутных мышей развивается прогрессирующая катаракта с потерей оптических свойств хрусталика (Song et al., 2009). Можно полагать, что замена R276Q с потерей положительного заряда аминокислоты приведет к нарушению сборки промежуточных филаментов и будет способствовать раннему развитию у крыс OXYS катаракты – признака, по которому проводился селекционный отбор этих животных и сцепленно с которым они унаследовали синдром преждевременного старения (Kolosova et al., 2014).

#### Патологии мышечной ткани (саркопения и кардиомиопатия)

Замена R815W в SR1 домене *Akap6* также может вносить вклад в развитие мышечных патологий. Показано, что *AKAP6* играет ключевую роль в регенерации скелетных мышц, взаимодействуя с миогенином, а его подавление приводит к нарушению формирования мышечных волокон и снижению двигательной активности у мышей (Lee et al., 2015). Кроме того, через спектриновые повторы *AKAP6* функционирует как адаптерный белок в кардиомиоцитах, обеспечивая связь ядерной оболочки с центром организации микротрубочек, что критически важно для нормальной работы сердца (Vergara Jauregui et al., 2020).

Замена R3671W в *Сmya5* локализуется в FN3-1 домене и нарушает внутридоменные взаимодействия с другими аминокислотными остатками, что может привести к ослаблению взаимодействия с титином и дестабилизации саркомеров как в скелетной, так и в сердечной мышечной ткани (Sargparanta, 2008; Sargparanta et al., 2010). Нарушение структурной целостности миофибрилл может способствовать развитию характерных для крыс OXYS саркопении и гипертрофической кардиомиопатии (Vays et al., 2014; Muraleva et al., 2017; Lu et al., 2022).

#### Расстройства липидного метаболизма

Нарушения липидного обмена вносят существенный вклад в патогенез БА (Di Paolo, Kim, 2011). Конформация ApoB-100 в гепарин-связывающем домене определяет

эффективность взаимодействия ЛПНП с протеогликанами внеклеточного матрикса в субэндотелиальном слое сосудов. ЛПНП подвергаются модификациям (агрегации, окислению), что запускает воспалительные реакции и усиливает атерогенез (Öörni, Lorey, 2025). Замена L3413F в этом домене ApoB у крыс OXYS могла бы нарушать данную функцию, потенциально способствуя дислипидемии, системному окислительному стрессу и развитию БА, однако на основе проведенного анализа консервативности аминокислотного остатка и предсказания структуры белка мы оцениваем ее эффект как минорный. Известно, что в период активной манифестации признаков БА дислипидемия и окислительный стресс у крыс OXYS не выявляются, а уровень холестерина в крови снижен (Tikhonova et al., 2014). При этом показано, что сосудистая дисфункция вносит существенный вклад в развитие у крыс OXYS как признаков БА (Stefanova et al., 2018) и ВМД (Zhdankina et al., 2023), так и гипертрофической кардиомиопатии (Muraleva et al., 2017). Выявленная замена V695L в *Abca1*, вероятно, функционально незначима, поскольку локализуется в гидрофобном трансмембранном домене и не нарушает его структуру. В то же время следует отметить, что ABCA1 играет ключевую роль не только в метаболизме липидов головного мозга, но и в выведении бета-амилоида, а его генетические вариации вносят значительный вклад в развитие БА (Holstege et al., 2022).

#### Заключение

Полногеномное секвенирование с высоким покрытием (>25×), выполненное для трех животных линии OXYS и трех – контрольной линии Wistar/Jcgn, позволило идентифицировать генетические варианты, фиксированные у крыс OXYS в гомозиготном состоянии. На основе сравнительного анализа были выявлены уникальные, не встречающиеся у других линий крыс варианты, которые способны внести вклад в формирование у крыс OXYS фенотипа преждевременного старения и раннее развитие возраст-зависимых заболеваний. В отношении нейродегенерации потенциально патогенными представляются следующие: крупная делеция в энхансере *Fat1*, способная привести к дисрегуляции экспрессии гена во время нейрогенеза; миссенс-замена в гене *Cic*, которая может нарушить баланс пролиферации и дифференцировки нейронов; варианты в *Akap6* и *Nqo2* – привести к когнитивному дефициту; и делеция в промоторе *Gsta6* – ослабить детоксикационную функцию кодируемого фермента в мозге. Раннее развитие ретинопатии может быть обусловлено делецией промоторного региона *Abcf1*, способной дестабилизировать гомеостаз сетчатки, и миссенс-заменами в *Cerkl*, которые могут снизить защиту фоторецепторов и клеток РПЭ от окислительного стресса. Миссенс-замена в *Bfsp1* способна нарушить сборку промежуточных филаментов хрусталика, приводя к формированию катаракты. Развитие у крыс OXYS кардиомиопатии и саркопении, вероятно, связано с миссенс-заменой в *Сmya5*, приводящей к нарушению стабилизации миофибрилл, и миссенс-заменой в *Akap6*, влияющей на процессы регенерации скелетных мышц и структурную организацию кардиомиоцитов. Идентифици-

рованные кандидатные аллели представляют собой основу для проведения функционального анализа и дальнейшего изучения молекулярных механизмов преждевременного старения крыс OXYS.

## Список литературы/ References

- Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., ... Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J.M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493-500. doi 10.1038/s41586-024-07487-w
- Abyzov A., Urban A.E., Snyder M., Gerstein M. CNVnator: an approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. *Genome Res*. 2011;21(6):974-984. doi 10.1101/gr.114876.110
- Ahmed A.F., De Bock C.E., Lincz L.F., Pundavela J., Zouikr I., Sonntag E., Hondermarck H., Thorne R.F. FAT1 cadherin acts upstream of Hippo signalling through TAZ to regulate neuronal differentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(23):4653-4669. doi 10.1007/s00018-015-1955-6
- Aleman T.S., Soumitra N., Cideciyan A.V., Sumaroka A.M., Ramprasad V.L., Herrera W., Windsor E.A.M., ... Inglehearn C.F., Kumaramanickavel G., Stone E.M., Fishman G.A., Jacobson S.G. CERKL mutations cause an autosomal recessive cone-rod dystrophy with inner retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(12):5944. doi 10.1167/iovs.09-3982
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Version 0.11.9. 2010. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (Accessed 12.25.25)
- Andrews S.J., Das D., Anstey K.J., Eastale S. Association of AKAP6 and MIR2113 with cognitive performance in a population-based sample of older adults. *Genes Brain Behav*. 2017;16(4):410-418. doi 10.1111/gbb.12368
- Broad Institute. Picard Toolkit. Version 2.26.11. 2022. Available at: <https://broadinstitute.github.io/picard/> (Accessed 12.25.25)
- Chung C.Y.T., Lo P.H.Y., Lee K.K.H. Babam2 regulates cell cycle progression and pluripotency in mouse embryonic stem cells as revealed by induced DNA damage. *Biomedicine*. 2020;8(10):397. doi 10.3390/biomedicine8100397
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., Whitwham A., Keane T., McCarthy S.A., Davies R.M., Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 2021;10(2):giab008. doi 10.1093/gigascience/giab008
- Davidson N.O., Shelness G.S. Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr*. 2000;20(1):169-193. doi 10.1146/annurev.nutr.20.1.169
- de la Cruz N., Bromberg S., Pasko D., Shimoyama M., Twigger S., Chen J., Chen C.F., ... Zuniga-Meyer A., Zhao L., Kwitek A., Tonelato P., Jacob H. The Rat Genome Database (RGD): developments towards a phenotype database. *Nucleic Acids Res*. 2004;33(D1):D485-D491. doi 10.1093/nar/gki050
- Devaytkin V.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Identification of single-nucleotide polymorphisms in mitochondria-associated genes capable of affecting the development of hypertrophic cardiomyopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Adv Gerontol*. 2020a;10(2):121-127. doi 10.1134/S2079057020020058
- Devaytkin V.A., Redina O.E., Kolosova N.G., Muraleva N.A. Single-nucleotide polymorphisms associated with the senescence-accelerated phenotype of OXYS rats: a focus on Alzheimer's disease-like and age-related-macular-degeneration-like pathologies. *J Alzheimer's Dis*. 2020b;73(3):1167-1183. doi 10.3233/JAD-190956
- Di Paolo G., Kim T.-W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(5):284-296. doi 10.1038/nrn3012
- Dodge-Kafka K.L., Soughayer J., Pare G.C., Carlisle Michel J.J., Langeberg L.K., Kapiloff M.S., Scott J.D. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*. 2005;437(7058):574-578. doi 10.1038/nature03966
- Dyer S.C., Austine-Orimoloye O., Azov A.G., Barba M., Barnes I., Barrera-Enriquez V.P., Becker A., ... Finn R.D., Freeberg M.A., Harrison P.W., Martin F.J., Yates A.D. Ensembl 2025. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(D1):D948-D957. doi 10.1093/nar/gkae1071
- Eilbeck K., Lewis S.E., Mungall C.J., Yandell M., Stein L., Durbin R., Ashburner M. The Sequence Ontology: a tool for the unification of genome annotations. *Genome Biol*. 2005;6(5):R44. doi 10.1186/gb-2005-6-5-r44
- El'darov Ch.M., Vays V.B., Vangeli I.M., Kolosova N.G., Bakeeva L.E. Morphometric examination of mitochondrial ultrastructure in aging cardiomyocytes. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;80(5):604-609. doi 10.1134/S0006297915050132
- Figueira I., Fernandes A., Mladenovic Djordjevic A., Lopez-Contreras A., Henriques C.M., Selman C., Ferreira E., Gonos E.S., Trejo J.L., Misra J., Rasmussen L.J., Xapelli S., Ellam T., Bellantuono I. Interventions for age-related diseases: shifting the paradigm. *Mech Ageing Dev*. 2016;160:69-92. doi 10.1016/j.mad.2016.09.009
- Flood C., Gustafsson M., Pitas R.E., Arnaboldi L., Walzem R.L., Borén J. Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(3):493-500. doi 10.1161/01.ATV.0000117174.19078.85
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):1-12. doi 10.1016/j.mam.2008.08.006
- García-Arroyo R., Gavalda-Navarro A., Villarroya F., Marfany G., Mirra S. Overexpression of CERKL protects retinal pigment epithelium mitochondria from oxidative stress effects. *Antioxidants*. 2021;10(12):2018. doi 10.3390/antiox10122018
- García-Arroyo R., Marfany G., Mirra S. CERKL, a retinal dystrophy gene, regulates mitochondrial transport and dynamics in hippocampal neurons. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11593. doi 10.3390/ijms231911593
- Ghanbari-Niaki A., Khabazian B.M., Hossaini-Kakhak S.A., Rahbarizadeh F., Hedayati M. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(4):841-846. doi 10.1016/j.bbrc.2007.07.100
- Guo F., Ding Y., Cabero N., Alvarado G., Wang F., Chen R., Li W. ABCF1 extrinsically regulates retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Mol Biol Cell*. 2015;26(12):2311-2320. doi 10.1091/mbc.E14-09-1343
- Helmbacher F. Tissue-specific activities of the Fat1 cadherin cooperate to control neuromuscular morphogenesis. *PLoS Biol*. 2018;16(5):e2004734. doi 10.1371/journal.pbio.2004734
- Holstege H., Hulsman M., Charbonnier C., Grenier-Boley B., Quenez O., Grozeva D., van Rooij J.G.J., ... van Duijn C.M., Williams J., Nicolas G., Bellenguez C., Lambert J.C. Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as risk factors for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2022;54(12):1786-1794. doi 10.1038/s41588-022-01208-7
- Hourigan B., Balay S.D., Yee G., Sharma S., Tan Q. Capicua regulates the development of adult-born neurons in the hippocampus. *Sci Rep*. 2021;11(1):11725. doi 10.1038/s41598-021-91168-5
- Islam F., Shilton B.H. Insights into the cellular function and mechanism of action of quinone reductase 2 (NQO2). *Biochem J*. 2025;482(6):309-324. doi 10.1042/BCJ20240103
- Janda E., Boutin J.A., De Lorenzo C., Arbitrio M. Polymorphisms and pharmacogenomics of NQO2: the past and the future. *Genes*. 2024;15(1):87. doi 10.3390/genes15010087
- Jiang Z., Zhang W., Zeng Z., Tang D., Li C., Cai W., Chen Y., Li Y., Jin Q., Zhang X., Yin L., Liu X., Xu Y., Dai Y. A comprehensive investigation discovered the novel methyltransferase METTL24 as one presumably prognostic gene for kidney renal clear cell carcinoma potentially modulating tumor immune microenvironment. *Front Immunol*. 2022;13:926461. doi 10.3389/fimmu.2022.926461



- Kolosova N.G., Aidagulova S.V., Nepomnyashchikh G.I., Shabalina I.G., Shalbuva N.I. Dynamics of structural and functional changes in hepatocyte mitochondria of senescence-accelerated OXYS rats. *Bull Exp Biol Med.* 2001;132(2):814-819. doi 10.1023/a:1013014919721
- Kolosova N.G., Shcheglova T.V., Sergeeva S.V., Loskutova L.V. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol Aging.* 2006;27(9):1289-1297. doi 10.1016/j.neurobiolaging.2005.07.022
- Kolosova N.G., Stefanova N.A., Korbolina E.E., Fursova A.Zh., Kozhevnikova O.S. Senescence-accelerated OXYS rats: a genetic model of premature aging and age-related diseases. *Adv Gerontol.* 2014;4(4):294-298. doi 10.1134/S2079057014040146
- Lee S.W., Won J.Y., Yang J., Lee J., Kim S.Y., Lee E.J., Kim H.S. AKAP6 inhibition impairs myoblast differentiation and muscle regeneration: positive loop between AKAP6 and myogenin. *Sci Rep.* 2015;5:16523. doi 10.1038/srep16523
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. doi 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079. doi 10.1093/bioinformatics/btp352
- Li Q., Ching A.K.-K., Chan B.C.-L., Chow S.K.-Y., Lim P.-L., Ho T.C.-Y., Ip W.-K., Wong C.-K., Lam C.W.-K., Lee K.K.-H., Chan J.Y.-H., Chui Y.-L. A death receptor-associated anti-apoptotic protein, BRE, inhibits mitochondrial apoptotic pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52106-52116. doi 10.1074/jbc.M408678200
- Lu F., Ma Q., Xie W., Liou C.L., Zhang D., Sweat M.E., Jardin B.D., Naya F.J., Guo Y., Cheng H., Pu W.T. CMYA5 establishes cardiac dyad architecture and positioning. *Nat Commun.* 2022;13(1):2185. doi 10.1038/s41467-022-29902-4
- Mackiewicz J., Tomczak J., Lisek M., Guo F., Boczek T. AKAP6 controls NFATc4 activity for BDNF-mediated neuroprotection. *Mol Brain.* 2024;17(1):85. doi 10.1186/s13041-024-01157-8
- Markovets A.M., Saprunova V.B., Zhdankina A.A., Fursova A.Zh., Baakeeva L.E., Kolosova N.G. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Aging.* 2010;3(1):44-54. doi 10.18632/aging.100243
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernysky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi 10.1101/gr.107524.110
- McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R.S., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016;17(1):122. doi 10.1186/s13059-016-0974-4
- Mirra S., García-Arroyo R., B. Domènech E., Gavalda-Navarro A., Herrera-Úbeda C., Oliva C., García-Fernández J., Artuch R., Villarroya F., Marfany G. CERKL, a retinal dystrophy gene, regulates mitochondrial function and dynamics in the mammalian retina. *Neurobiol Dis.* 2021;156:105405. doi 10.1016/j.nbd.2021.105405
- Muraleva N.A., Devyatkin V.A., Kolosova N.G. Phosphorylation of αB-crystallin in the myocardium: analysis of relations with aging and cardiomyopathy. *Exp Gerontol.* 2017;95:26-33. doi 10.1016/j.exger.2017.05.009
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166-1167. doi 10.1093/bioinformatics/bts091
- Öörni K., Lorey M.B. Beyond cholesterol: linking the conformation of apolipoprotein B to atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2025;36(5):226-231. doi 10.1097/MOL.0000000000000997
- Oram J.F. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):720-727. doi 10.1161/01.ATV.0000054662.44688.9A
- Pedersen B.S., Layer R., Quinlan A.R. smooove: structural-variant calling and genotyping with existing tools. 2020. Available at: <https://github.com/brentp/smoove> (Accessed 12.25.25)
- Peng Z., Gong Y., Liang X. Role of FAT1 in health and disease. *Oncol Lett.* 2021;21(5):398. doi 10.3892/ol.2021.12659
- Perng M.-D., Zhang Q., Quinlan R.A. Insights into the beaded filament of the eye lens. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2180-2188. doi 10.1016/j.yexcr.2007.04.005
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-575. doi 10.1086/519795
- Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-842. doi 10.1093/bioinformatics/btq033
- RatGTEx Consortium. RatGTEx Portal, version 4. UC San Diego. 2021. Available at: <https://ratgtex.org>, RRID:SCR\_022145 (Accessed 12.25.25)
- Rayan N.A., Kumar V., Aow J., Rastegar N., Lim M.G.L., O'Toole N., Aliwarga E., ... Anacker C., Hen R., Parent C., Meaney M.J., Prabhakar S. Integrative multi-omics landscape of fluoxetine action across 27 brain regions reveals global increase in energy metabolism and region-specific chromatin remodelling. *Mol Psychiatry.* 2022;27(11):4510-4525. doi 10.1038/s41380-022-01725-1
- Riascos-Bernal D.F., Ressa G., Korrapati A., Sibinga N.E.S. The FAT1 cadherin drives vascular smooth muscle cell migration. *Cells.* 2023;12(12):1621. doi 10.3390/cells12121621
- Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-26. doi 10.1038/nbt.1754
- Rousseaux M.W., Tschumperlin T., Lu H.C., Lackey E.P., Bondar V.V., Wan Y.W., Tan Q., Adamski C.J., Friedrich J., Twede H., Clark G.D., Zoghbi H.Y. ATXN1-CIC complex is the primary driver of cerebellar pathology in spinocerebellar ataxia type 1 through a gain-of-function mechanism. *Neuron.* 2018;97(6):1235-1243.e5. doi 10.1016/j.neuron.2018.02.013
- Rudnitskaya E.A., Kozlova T.A., Burnyasheva A.O., Tarasova A.E., Pankova T.M., Starostina M.V., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Features of postnatal hippocampal development in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2020;14:533. doi 10.3389/fnins.2020.00533
- Sarparanta J. Biology of myospryn: what's known? *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29(6-8):177-180. doi 10.1007/s10974-008-9165-6
- Sarparanta J., Blandin G., Charton K., Vihola A., Marchand S., Milic A., Hackman P., Ehler E., Richard I., Udd B. Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies. *J Biol Chem.* 2010;285(39):30304-30315. doi 10.1074/jbc.M110.108720
- Sattarova E.A., Sinitsyna O.I., Vasyunina E.A., Duzhak A.B., Kolosova N.G., Zharkov D.O., Nevinsky G.A. Age-dependent guanine oxidation in DNA of different brain regions of Wistar rats and prematurely aging OXYS rats. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(6):3542-3552. doi 10.1016/j.bbagen.2013.01.027
- Schubert M., Lindgreen S., Orlando L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res Notes.* 2016;9(1):88. doi 10.1186/s13104-016-1900-2
- Sen P., Maitra P., Natarajan S., Sriprya S., Mathavan S., Bhende M., Manchegowda P.T. CERKL mutation causing retinitis pigmentosa (RP) in Indian population – a genotype and phenotype correlation study. *Ophthalmic Genet.* 2020;41(6):570-578. doi 10.1080/13816810.2020.1814347
- Song S., Landsbury A., Dahm R., Liu Y., Zhang Q., Quinlan R.A. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1837-1848. doi 10.1172/JCI38277
- Stefanova N.A., Kolosova N.G. The rat brain transcriptome: from infancy to aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1462. doi 10.3390/ijms24021462



- Stefanova N., Kozhevnikova O., Vitovtov A., Maksimova K., Logvinov S., Rudnitskaya E., Korbolina E., Muraleva N., Kolosova N. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. *Cell Cycle*. 2014;13(6):898-909. doi 10.4161/cc.28255
- Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *BMC Genomics*. 2018;19(Suppl.3):75. doi 10.1186/s12864-018-4480-9
- Suvakov M., Panda A., Diesh C., Holmes I., Abyzov A. CNVpytor: a tool for copy number variation detection and analysis from read depth and allele imbalance in whole-genome sequencing. *GigaScience*. 2021;10(11):giab074. doi 10.1093/gigascience/giab074
- Telegina D.V., Korbolina E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy. *Cell Cycle*. 2015;14(22):3544-3556. doi 10.1080/15384101.2015.1080399
- Tikhonova M.A., Yu C.H., Kolosova N.G., Gerlinskaya L.A., Maslennikova S.O., Yudina A.V., Loskutov Y.V., Aftanas L.I. Comparison of behavioral and biochemical deficits in rats with hereditary defined or D-galactose-induced accelerated senescence: evaluating the protective effects of diosgenin. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;120:7-16. doi 10.1016/j.pbb.2014.01.012
- Tomczak J., Mackiewicz J., Lisek M., Kaluza A., Boczek T. Exploring AKAPs in visual signaling. *Front Mol Neurosci*. 2024;17:1412407. doi 10.3389/fnmol.2024.1412407
- Tuson M., Marfany G., González-Duarte R. Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):128-138. doi 10.1086/381055
- Tyumentsev M.A., Stefanova N.A., Muraleva N.A., Rumyantseva Y.V., Kiseleva E., Vavilin V.A., Kolosova N.G. Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. *J Alzheimer's Dis*. 2018;63(3):1075-1088. doi 10.3233/JAD-180065
- Vays V.B., Eldarov C.M., Vangely I.M., Kolosova N.G., Bakeeva L.E., Skulachev V.P. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure. *Aging*. 2014;6(2):140-148. doi 10.18632/aging.100636
- Vergarajauregui S., Becker R., Steffen U., Sharkova M., Esser T., Petzold J., Billing F., Kapiloff M.S., Schett G., Thievessen I., Engel F.B. AKAP6 orchestrates the nuclear envelope microtubule-organizing center by linking Golgi and nucleus via AKAP9. *eLife*. 2020;9:e61669. doi 10.7554/elife.61669
- Wang H., Ouyang G., Zhu Y. D348N mutation of BFSP1 gene in congenital cataract: it does matter. *Cell Biochem Biophys*. 2023;81(4):757-763. doi 10.1007/s12013-023-01169-6
- Wickham H. ggplot2. Use R! Springer Cham, 2016. doi 10.1007/978-3-319-24277-4
- Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L., François R., Grolemund G., ... Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Software*. 2019;4(43):1686. doi 10.21105/joss.01686
- Wilcox S.M., Arora H., Munro L., Xin J., Fenninger F., Johnson L.A., Pfeifer C.G., Choi K.B., Hou J., Hoodless P.A., Jefferies W.A. The role of the innate immune response regulatory gene ABCF1 in mammalian embryogenesis and development. *PLoS One*. 2017;12(5):e0175918. doi 10.1371/journal.pone.0175918
- Wong D., Yip S. Making heads or tails – the emergence of *capicua* (*CIC*) as an important multifunctional tumour suppressor. *J Pathol*. 2020;250(5):532-540. doi 10.1002/path.5400
- Wu C., Orozco C., Boyer J., Leglise M., Goodale J., Batalov S., Hodge C.L., Haase J., Janes J., Huss J.W. 3rd, Su A.I. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. 2009;10(11):R130. doi 10.1186/gb-2009-10-11-r130
- Yip S., Butterfield Y.S., Morozova O., Chittaranjan S., Blough M.D., An J., Birol I., ... Jones S.J., Morin G.B., Chan J.A., Cairncross J.G., Marra M.A. Concurrent *CIC* mutations, *IDH* mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol*. 2012;226(1):7-16. doi 10.1002/path.2995
- Zhang Y., Liu T., Meyer C.A., Eeckhoutte J., Johnson D.S., Bernstein B.E., Nusbaum C., Myers R.M., Brown M., Li W., Liu X.S. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. 2008;9(9):R137. doi 10.1186/gb-2008-9-9-r137
- Zhdankina A.A., Tikhonov D.I., Logvinov S.V., Plotnikov M.B., Khlebnikov A.I., Kolosova N.G. Suppression of age-related macular degeneration-like pathology by c-Jun N-terminal kinase inhibitor IQ-1S. *Biomedicines*. 2023;11(2):395. doi 10.3390/biomedicines11020395
- Zheng X., Kong W., Dai X., You C. YBX1 modulates 8-oxoguanine recognition and repair in DNA. *ACS Chem Biol*. 2025;20(2):433-442. doi 10.1021/acscchembio.4c00831

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.12.2025. После доработки 28.05.2026. Принята к публикации 29.05.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-91

# Epigenetic regulation of the transcriptional activity of genes mediating the neuroprotective activity of ceftriaxone in the brain in a rat model of sporadic Alzheimer disease: the involvement of histone deacetylase 1

A.A. Bashirzade <sup>1</sup>, M.A. Tikhonova <sup>1</sup> , V.M. Belichenko<sup>1</sup>, L.A. Fedoseeva <sup>1, 2</sup>, M.D. Belyaev<sup>2</sup>, T.-Y. Renn <sup>3</sup>, H.-M. Chang <sup>3</sup>, N.G. Kolosova <sup>2</sup>, N.D. Belyaev<sup>1</sup>, T.G. Amstislavskaya <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

 tikhonovama@neuronm.ru

**Abstract.** Histone deacetylases (HDACs) are enzymes that provide transcriptional repression, while HDAC inhibitors are considered to be potential drugs in the treatment of Alzheimer disease (AD). Earlier we found that ceftriaxone (CEF), an antibiotic with neuroprotective activity, augmented mRNA levels of *Ide* and *Mme*, encoding enzymes involved in the catabolism of amyloid beta in the amygdala of OXYS rats, a model of sporadic AD. On the other hand, disturbances of neurotrophic factors (BDNF in particular) play an important role in AD pathogenesis. Moreover, HDACs of class I (HDAC1) are involved in the regulation of *Bdnf* transcriptional activity. The study was aimed to assess the effects of CEF on HDAC1 enrichment at *Mme*, *Ide*, and *Bdnf* gene promoters in the amygdala of OXYS rats and on *Bdnf* mRNA levels in the amygdala of OXYS and Wistar rats. Chromatin immunoprecipitation and qPCR were utilized for epigenetic analysis and assay of *Bdnf* mRNA levels, respectively. Neither significant HDAC1 enrichment, nor its alteration under CEF treatment at the *Mme* or *Ide* promoters were found, whereas CEF attenuated HDAC1 binding at *Bdnf* promoter IV. This is a novel mechanism of transcription regulation by CEF in the brain, which may be involved in its neuroprotective activity. In 5-month-old OXYS rats, it seems to play a minor role, as CEF did not change *Bdnf* transcript 5 (containing exons IV and IX) levels. We were first to demonstrate the transcript-specific regulation of *Bdnf* transcription by CEF. CEF significantly increased the levels of *Bdnf* transcript 6 (containing exons VII, VIII, and IX). The results of our study can be taken into account in AD treatment.

**Key words:** Alzheimer's disease; histone deacetylase; ceftriaxone; neuroprotection; amyloid metabolism; BDNF

**For citation:** Bashirzade A.A., Tikhonova M.A., Belichenko V.M., Fedoseeva L.A., Belyaev M.D., Renn T.-Y., Chang H.-M., Kolosova N.G., Belyaev N.D., Amstislavskaya T.G. Epigenetic regulation of the transcriptional activity of genes mediating the neuroprotective activity of ceftriaxone in the brain in a rat model of sporadic Alzheimer disease: the involvement of histone deacetylase 1. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):899-907. doi 10.18699/vjgb-26-91

**Funding.** The study was supported by budgetary funding for basic research of the Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine (projects 122042700001-9, 126020316369-9).

**Acknowledgements.** We are grateful to Ekaterina E. Pisareva, Alla S. Avdeeva, and Inna Lytkina (née Yarantseva) for technical assistance in total RNA extraction and reverse transcription procedures for qPCR analysis of mRNA levels.

## Эпигенетическая регуляция транскрипционной активности генов, связанных с нейропротекторным действием цефтриаксона, в головном мозге у крыс на модели sporadic Alzheimer disease: участие гистоновой деацетилазы 1

А.А. Баширзаде <sup>1</sup>, М.А. Тихонова <sup>1</sup> , В.М. Беличенко<sup>1</sup>, Л.А. Федосеева <sup>1, 2</sup>, М.Д. Беляев<sup>2</sup>, Т.-И. Ренн <sup>3</sup>, Х.-М. Чан <sup>3</sup>, Н.Г. Колосова <sup>2</sup>, Н.Д. Беляев<sup>1</sup>, Т.Г. Амстиславская <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

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

<sup>3</sup> Тайбэйский медицинский университет, Тайбэй, Тайвань

 tikhonovama@neuronm.ru

**Аннотация.** Гистоновые деацетилазы (HDAC) – это ферменты, обеспечивающие подавление транскрипции генов, а ингибиторы HDAC рассматриваются как потенциальные лекарственные средства для лечения болезни Альцгеймера (БА). Ранее мы обнаружили, что цефтриаксон, антибиотик с нейропротекторной активностью, повышает уровни мРНК генов *Ide* и *Mme*, кодирующих ферменты, которые участвуют в катаболизме амилоида-бета, в миндалине мозга у крыс линии OXYS, модели спорадической БА. С другой стороны, нарушения нейротрофических факторов (в частности, BDNF) играют важную роль в патогенезе БА. Более того, HDAC класса I (HDAC1) участвуют в регуляции транскрипционной активности *Bdnf*. Целью данного исследования было оценить влияние цефтриаксона на обогащение HDAC1 в промоторах генов *Mme*, *Ide* и *Bdnf* в миндалине у крыс OXYS и на уровни мРНК *Bdnf* в миндалине крыс OXYS и Вистар. Для эпигенетического анализа и определения уровней мРНК *Bdnf* использовали хроматин-иммунопреципитацию и количественную ПЦР, соответственно. Не выявлено значимого обогащения HDAC1 или его изменений под действием цефтриаксона в промоторах *Mme* и *Ide*. В то же время цефтриаксон ослаблял связывание HDAC1 с промотором IV *Bdnf*. Это новый механизм регуляции транскрипции в головном мозге цефтриаксоном, который может быть задействован в его нейропротекторной активности. У 5-месячных крыс OXYS он, по-видимому, играет минорную роль, поскольку цефтриаксон не изменял уровни транскрипта 5 *Bdnf*, содержащего экзоны IV и IX. Мы также впервые продемонстрировали транскрипт-специфическую регуляцию транскрипции *Bdnf* с помощью цефтриаксона. Цефтриаксон значительно повысил уровни транскрипта 6 *Bdnf*, содержащего экзоны VII, VIII и IX. Результаты исследования могут быть учтены при терапии БА.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера; гистоновая деацетилаза; цефтриаксон; нейропротекция; метаболизм амилоида; BDNF

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an incurable multifactorial neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive decline induced by the accumulation of amyloid beta (A $\beta$ ) in the brain, which triggers synaptic plasticity dysfunction, neuronal deficits, and memory loss. Most of the current AD therapies do not stop the disease progression and provide only temporary symptomatic relief. Hence, the development of new treatment strategies that target the key pathogenetic factors in AD development is needed.

Epigenetic factors are considered to make a significant contribution to AD development. Many studies have demonstrated the involvement of different epigenetic mechanisms in the pathogenesis of neurodegeneration in AD (Nikolac Perkovic et al., 2021). Most often, this concerns DNA methylation/demethylation (Poon et al., 2020), posttranslational modifications of histones (Ramazi et al., 2020), and regulation by various forms of noncoding RNAs (Idda et al., 2018). Acetylation/deacetylation of histones at lysine is one of the most common and studied mechanisms of chromatin compaction (Shvedunova, Akhtar, 2022). It is regulated by two types of enzymes: histone acetyltransferases and histone deacetylases (HDACs). HDACs are enzymes that remove acetyl groups from lysine residues in the amino terminal tails of histone proteins. The resulting chromatin compaction, in turn, causes transcriptional and translational repression (Sada et al., 2020). HDAC inhibitors are considered potential drugs in AD treatment (Bondarev et al., 2021).

Increasing the expression and/or enzymatic activity of proteins involved in A $\beta$  cleavage has long been considered a promising targeted approach in AD treatment (Zhang et al., 2023). Neprilysin or membrane metalloendopeptidase (MME), being the major amyloid-degrading enzyme in the brain, plays a significant role in AD pathogenesis, in particular, in the late onset sporadic form (Nalivaeva et al., 2020). Regulation of MME expression by HDACs has been revealed in cell cultures. In SH-SY5Y cells, the endopeptidase promoter interacts with HDAC1 and lacks typical histone acetylation

### Abbreviations

A $\beta$ , amyloid-beta;  
AD, Alzheimer's disease;  
AICD, APP intracellular domain;  
APP, amyloid precursor protein;  
BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor;  
*BDNF/Bdnf*, gene for BDNF;  
CA, cornu Ammonis of the hippocampus;  
CEF, ceftriaxone;  
ChIP, chromatin immunoprecipitation;  
FP, forward primers;  
*Gapdh*, gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;  
HDAC, histone deacetylase;  
*Hprt1*, gene encoding hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1;  
IDE, Insulin-degrading enzyme;  
*IDE/Ide*, gene for IDE;  
MME, membrane metalloendopeptidase;  
*MME/Mme*, gene for MME; NF $\kappa$ B, nuclear factor kappa B;  
NMDA receptor, N-methyl-D-aspartate receptor;  
qPCR, quantitative real-time PCR;  
RP, reverse primers;  
TSS, Transcription Start Site;  
tr.var., transcript variant

marks, such as H4K16 and H4K8. In human HUVEC cells, 15-fold enrichment of *MME* promoters in HDAC1 has been observed (Belyaev et al., 2009).

Another metallopeptidase, insulinase, also known as insulin-degrading enzyme (IDE), together with MME is one of the main enzymes that participate in the extra- and intracellular degradation of A $\beta$  (Kurochkin et al., 2018). Enrichment of the *IDE* gene promoter in HDACs of class I (but not class III) was significantly reduced in the cell culture of neuron-like SH-SY5Y cells overexpressing APP751 and APP770 (Nalivaeva et al., 2016).

Ceftriaxone (CEF) is a third-generation cephalosporin antibiotic with neuroprotective activity. The drug is extensively applied in preclinical studies on models of neurological disorders. The studies have revealed beneficial effects of CEF in AD-like pathology (Zumkehr et al., 2015; Hefendehl et al., 2016; Tikhonova et al., 2017, 2021). Moreover, long-term treatment with CEF, even over several months, is found to be safe in laboratory rodents (Ratti et al., 2015) and in humans in clinical trials on CEF as a neuroprotective agent in amyotrophic lateral sclerosis (Cudkowicz et al., 2014) or Parkinson's disease dementia<sup>1</sup>. Suppression of glutamate-induced excitotoxicity was long regarded as the main neuroprotective effect of CEF. However, additional mechanisms of its neuroprotective effects such as an activity targeted at the proteostasis network or pathological aggregation of proteins are suspected (Kumari, Deshmukh, 2021). Indeed, our group has shown that CEF attenuates A $\beta$  load in the brains of mice with A $\beta$ -induced AD-like pathology (Tikhonova et al., 2021). Moreover, CEF changes the transcriptional activity of genes encoding enzymes involved in the catabolism of A $\beta$ . In OXYS rats, which are a model of accelerated senescence and sporadic AD (Stefanova et al., 2014), administration of CEF resulted in the restoration of cognitive and neuronal deficits (Tikhonova et al., 2017) associated with an increase in the mRNA levels of *Ide* and *Mme* in the amygdala (Rasero et al., 2017) but not in the hippocampus or frontal cortex (Tikhonova et al., 2018). Amygdala is a brain structure that is closely associated with learning and memory function and is involved in the pathogenesis of AD since the early stages of disease progression. However, the mechanisms of the effect of CEF on the transcriptional activity of endopeptidases remain unknown. Here, we checked whether CEF might influence the expression of genes encoding MME and IDE through the epigenetic regulation of HDAC1 enrichment of the gene promoters.

The search for means enhancing the clearance of intracellular amyloid oligomers using a system of degrading enzymes is not the only direction being developed for AD therapy. There are other approaches, in particular, those related to increasing neuroprotection and neurotrophic function in brain structures. BDNF is the most abundant neurotrophic factor in the central nervous system. It supports the processes of neurogenesis and neuroplasticity and it is involved in learning and memory processes. According to the results of meta-analyses, patients with AD have decreased BDNF levels in the blood and brain (Du et al., 2018; Ng et al., 2019). Moreover, CEF restores the reduced BDNF levels in the striatum of rats in the MPTP-induced model of Parkinson's disease (Kaur, Prakash, 2017). Earlier we found that alterations in neurotrophic balance indicating increased apoptosis precede the development of AD-like pathology in OXYS rats. Rapid progression of AD-like pathology in OXYS rats is accompanied by the suppression of activity of the neurotrophin system (Rudnitskaya et al., 2017). Hence, we assumed a modulating effect of CEF on the transcriptional activity of *Bdnf* in the brain of OXYS rats. On

the other hand, previous studies revealed that the modulation of the transcriptional activity of *Bdnf* was associated with alterations in HDAC1 binding at the *Bdnf*-IV promoter in the hippocampus of early-life iron-deficient rats (Tran et al., 2015).

Thus, this study was aimed to assess the effect of CEF on the mRNA levels of *Bdnf* in the amygdala of OXYS and Wistar rats and to evaluate the involvement of enrichment of the gene promoters in HDACs of class I (HDAC1) in the CEF effects on the expression of *Mme*, *Ide*, and *Bdnf* genes in the amygdala of OXYS rats.

## Materials and methods

**Experimental procedures involving animals.** The experiment was performed with 14-week-old male OXYS rats developed at the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, and male Wistar rats of the control parental strain of the same age. The animals were kept in cages (40 × 60 × 20 cm), five rats in each, with free access to standard chow for laboratory rats and water under standard conditions: a natural light–dark cycle 16 h light : 8 h dark, temperature 18–22 °C, relative humidity 50–60 %. The animals were divided into four experimental groups: OXYS Control, OXYS CEF, Wistar Control, and Wistar CEF. The Control groups were administered saline intraperitoneally (i.p.) while the CEF groups were treated with CEF i.p. at a daily dose of 100 mg/kg. Rats received 36 daily i.p. injections of CEF or saline according to the previously described design in the study of the effect of CEF on the expression of genes related to the system of A $\beta$  metabolism in the brain (Tikhonova et al., 2018). The rationale behind the CEF dosage – 100 mg/(kg·day) – and treatment duration adopted in the current study was based on our previous studies showing neuroprotective effects of CEF in correcting the behavioral and neuronal deficits in OXYS rats (Tikhonova et al., 2017) and the modulating effect of CEF on the expression of *Mme* and *Ide* in the amygdala of OXYS rats (Tikhonova et al., 2018). On day 37 the rats were sacrificed by exposure to CO<sub>2</sub> and decapitation. Immediately upon sacrifice, the amygdalae were rapidly dissected on ice, frozen in liquid nitrogen, and stored at –70 °C until further analysis.

The study of gene promoter enrichment in HDAC1 was performed in biosamples of the amygdala of rats from the OXYS Control ( $n = 5$ ) and OXYS CEF ( $n = 5$ ) groups, as we had not revealed significant effects of CEF treatment on the mRNA levels of *Ide* and *Mme* in Wistar rats (Tikhonova et al., 2018). The *Bdnf* transcriptional activity was assessed by mRNA levels in biosamples of the amygdala in rats of the OXYS Control ( $n = 8$ ), OXYS CEF ( $n = 10$ ), Wistar Control ( $n = 8$ ), and Wistar CEF ( $n = 10$ ) groups.

**Chromatin immunoprecipitation (ChIP).** The ChIP procedure was performed according to the previously published protocol (Zuccato et al., 2007) with minor modifications. Amygdala tissue was crushed into small pieces in a mortar with liquid nitrogen using a ceramic pestle. Next, the tissue mass was immersed in 1 % formaldehyde solution in PBS to fix DNA and proteins and intensively mixed for 10 min at 4 °C. Fixation was stopped by adding 1.25 M glycine solution. Then the samples were washed three times with cooled

<sup>1</sup> National Library of Medicine. To assess the efficacy and safety of ceftriaxone in patients with mild to moderate Parkinson's disease dementia. ClinicalTrials.gov ID NCT03413384. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03413384> (Accessed March, 11, 2026).



**Table 1.** Primers for the promoters of target genes

| Gene symbol               | Sequence                                                       | T <sub>1</sub> , °C | T <sub>2</sub> , °C | T <sub>3</sub> , °C |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Mme</i> (promoter I)   | F: 5'-GGACCTGAGAATGTGGGGA-3'<br>R: 5'-GGCTGCAGGAAGCTATGAAA-3'  | 60–64               | 84                  | 87                  |
| <i>Ide</i> (promoter I)   | F: 5'-GAAATGTCCTTACTCCCCA-3'<br>R: 5'-CACAAAGCGGTAGGTCCC-3'    | 61–63               | 89                  | 92.5                |
| <i>Bdnf</i> (promoter IV) | F: 5'-GATGAAAGTTTGGCTTCTGTG-3'<br>R: 5'-TCGGTGAATGGGAAAGTGG-3' | 55                  | 78                  | 82.5                |

Note. T<sub>1</sub>: annealing temperature; T<sub>2</sub>: temperature at fluorescence signal acquisition; T<sub>3</sub>: product melting temperature.

PBS solution and immersed in 1 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % deoxycholate, 1 mM PMSF). The samples were homogenized by passing through a 21G syringe needle. Ultrasonic treatment (sonication) of samples was performed using a Sonopuls mini20 sonicator (Bandelin, Germany) with a power of 20 W in a volume of 1 mL. Sonication mode used: eight times for 30 s with 2-min intervals. The DNA fragments obtained under these conditions were 500–1000 bp long. Then the samples were divided into three unequal parts: 10 % of the volume was allocated for input (i. e. DNA fragments with ligated protein, not treated with immune antibodies) and two equal parts, one for the interaction with specific antibodies against HDAC1 (Catalog # PA1-860, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, United States) and the other for the interaction with control nonimmune antibodies IgG (Catalog # 02-6102, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, United States). The input was stored at –20 °C until the stage of de-cross-linking the DNA and protein fractions. The ratio of antibody volume to sample volume was 1:500. The samples with antibodies were incubated at 4 °C overnight.

Protein G Sepharose (Catalog # ab193259, Abcam, UK) was incubated with 5 % BSA overnight. BSA-blocked Sepharose was added to the samples immediately after incubation with antibodies and intensively mixed in a shaker for 1 h at 4 °C. Sepharose samples were sequentially washed with solutions containing increasing concentrations of salts and nonionic detergents. The first wash solution consisted of lysis buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % deoxycholate, 1 mM PMSF). The second wash solution consisted of 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA. Sepharose beads were washed with 1 % SDS in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>.

Bound DNA and protein fractions including inputs were de-cross-linked by adding 5M NaCl and incubating at 65 °C overnight. The samples were then treated with proteinase K in the buffer containing 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, and 10 % SDS at 50°C for 1 h. DNA was isolated by phenol-chloroform extraction, precipitated with two volumes of 95 % ethanol, and washed twice with 70 % ethanol. The remaining alcohol was evaporated in a thermostat. The precipitate was dissolved in 22 µL of TE buffer (0.01 M Tris + 0.001 M EDTA, pH 8.0). The amount of isolated DNA was measured in a Nanodrop 2000C spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, United States).

To assess the enrichment of the promoter regions of the *Mme*, *Ide*, and *Bdnf* genes, semiquantitative real-time PCR was performed using a CFX96 Touch amplifier (Bio-Rad, United States) with the SYBR Green fluorescent dye. Sequences of specific primers for the promoters of the target genes (*Mme*, *Ide*, and *Bdnf*) were selected using Primer 3 (NCBI) (Table 1). The specificity of the primers was checked using the Primer-BLAST online software<sup>2</sup>. For *Bdnf*, we studied promoter IV as previous studies revealed the involvement of HDAC1 binding at the *Bdnf*-IV promoter in the modulation of the transcriptional activity of *Bdnf* (Tran et al., 2015). Loci that are homologous to primer sequences in the promoter region of the studied genes are shown in Figures 3a, 4a, and 5a.

The obtained amplicons homologous to the fragments of the specified promoters of the target genes in the samples treated with specific antibodies against HDAC1 or control non-immune IgG antibodies and inputs were loaded onto 1 % agarose gel containing ethidium bromide (1 mg/mL). Electrophoresis was performed in a horizontal chamber with 1x TAE buffer at 130 V for 40 min (PowerPac HC, BioRad, United States). The samples were visualized using the Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BioRad, United States). The DNA markers Step100 Long (Catalog # S-8055, Biolabmix, Novosibirsk, Russia) and Step50 plus (Catalog # S-8103, Biolabmix, Novosibirsk, Russia) were used for assessing DNA length.

The enrichment of the promoter regions in HDAC1 was calculated using Percent Input Method<sup>3</sup>. The mean Ct was calculated for each antibody type and input (n = 5). The adjusted mean Ct for the input (10 % of total DNA) was calculated as the difference between the mean Ct for the inputs and the binary logarithm of the dilution factor of 10 (log<sub>2</sub>10). For target and non-immune antibodies, the percentage of input was calculated as 100\*2<sup>ΔCt</sup>, where ΔCt is the difference between the adjusted mean Ct for the input and the mean Ct for samples treated with target/non-immune antibodies.

**Analysis of mRNA levels of *Bdnf* transcript variants using qPCR.** To analyze the transcriptional activity of the *Bdnf* gene under the conditions of our experiment, we used two pairs of primers that allowed us to study the expression of two different transcript variants. Despite the final protein product being selfsame, there are 10 validated transcripts of

<sup>2</sup> National Library of Medicine. Primer-BLAST. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Accessed October, 20, 2025).  
<sup>3</sup> Thermo Fisher Scientific Inc. ChIP Analysis. <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html> (Accessed October, 20, 2025).

**Table 2.** Primers used in qPCR analysis for target and reference genes

| Gene symbol           | Sequence                                                        | Amplicon size, bp | Annealing T, °C |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Target genes          |                                                                 |                   |                 |
| <i>Bdnf</i> -tr.var.5 | F: 5'-AGTACATATCGGCCACAAA-3'<br>R: 5'-ATGGTCATCACTCTTCTCACC-3'  | 178               | 62              |
| <i>Bdnf</i> -tr.var.6 | F: 5'-GTATCCGACCCTCTCTGTCC-3'<br>R: 5'-CAGCAATCGTTGTTCAGCTCC-3' | 135               | 56              |
| Reference genes       |                                                                 |                   |                 |
| <i>Hprt1</i>          | F: 5'-CATTGTGGCCCTCTGTGTG-3'<br>R: 5'-AACTTTTATGTCCCCGTTGA-3'   | 166               | 60              |
| <i>Gapdh</i>          | F: 5'-GTGCCAGCCTCGTCTCATA-3'<br>R: 5'-TCGTTGATGGCAACAATGTCC-3'  | 123               | 65              |

the rat *Bdnf* gene<sup>4</sup> which are involved in different functions (Baj et al., 2011). Here, we studied the levels of transcript variant 5 (*Bdnf*-tr.var.5; NM\_001270633.1) and transcript variant 6 (*Bdnf*-tr.var.6; NM\_001270634.1). *Bdnf*-tr.var.5 contains exons IV and IX and is the only transcript specific for exon IV (and its associated promoter region) among all *Bdnf* transcripts. *Bdnf*-tr.var.6 contains exons VII, VIII, and IX and is transcribed starting from exon VII – but not the exon IV-associated promoter region; its levels were assessed to evaluate transcript-specific effects of CEF. The primers were mapped onto the gene regions homologous to the transcript variants of interest using the UCSC Santa Cruz Genome Browser<sup>5</sup>. The specific *Bdnf* primers for the analysis of mRNA levels of *Bdnf*-tr.var.5 and *Bdnf*-tr.var.6 as well as the reference genes *Gapdh* and *Hprt1* were chosen using the Primer-BLAST online software<sup>6</sup>.

Extraction of total RNA from fresh-frozen rat amygdala samples was performed using RNeasy Minikit in accordance with the manufacturer’s recommendations (Qiagen, Germany). Residual genomic DNA was removed using DNase I (Promega, United States). The reverse transcriptase reaction was carried out as in (Tikhonova et al., 2018) with 160 units of reverse transcriptase (Biosan, Russia) and 1 × RT Buffer (Biosan, Russia). The temperature regime of reverse transcription included three steps: 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min, and 95 °C for 5 min.

The mRNA levels of target and reference genes were measured by qPCR according to a previously published protocol (Belichenko et al., 2023). The reaction was carried out in a LightCycler-480 II thermocycler (Roche, Switzerland) in master mix from a BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2 ×) reagent kit (BIOLABMIX, Novosibirsk, Russia) with forward and reverse specific primers (150 nM each; BIOSSET Ltd., Novosibirsk, Russia; Table 2), and a cDNA template.

All samples were analyzed in triplicate. The relative concentration of a tested cDNA was determined by the standard-curve quantitation method (Ginzinger, 2002) using the LightCycler 480 Software (Release 1.5.1) and calibration curves derived

from the dilutions of a standard cDNA. The standard cDNA solution for plotting the calibration curves was prepared by mixing aliquots from each synthesized cDNA sample. The expression value for a target gene was next normalized to the geometric mean mRNA levels of the two reference genes (*Hprt1* and *Gapdh*).

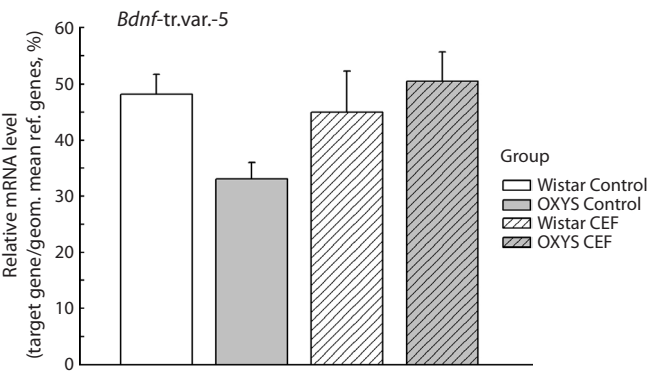
**Statistical analysis.** All results were presented as mean ± SEM. STATISTICA 10.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, United States) was used to perform all the statistical analyses. The normality of the data distribution was determined by the Shapiro–Wilk *W* test. To compare the enrichment of gene promoters in HDAC1, paired Student’s *t* test for dependent samples and Student’s *t* test for independent samples (in Welch’s modification) were used. Statistical evaluation of the *Bdnf*-tr.var.5 and *Bdnf*-tr.var.6 transcriptional data was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni’s post hoc test. Independent variables for the two-way ANOVA were *genotype* (Wistar or OXYS strain) and *treatment* (saline or CEF). The level of significance was defined as  $p < 0.05$  in all experiments reported here. The tendency level was accepted to be  $0.05 < p < 0.2$ .

Results

**Analysis of the levels of Bdnf transcript variants in the amygdala of OXYS and Wistar rats.** The levels of mRNA species for *Bdnf*-tr.var.-5 (the only *Bdnf* transcript containing exon IV) in the amygdala are summarized in Figure 1. According to two-way ANOVA, there was no significant effect of the *Treatment* factor [ $F(1, 32) = 1.245, p = 0.274$ ] but there was a tendency toward influence of the interaction between the factors of *Treatment* and *Genotype* [ $F(1, 32) = 2.565, p = 0.120$ ] on the mRNA levels of *Bdnf*-tr.var.-5 in the amygdala of the rats. The abundance of mRNA species for *Bdnf*-tr.var.-6 (*Bdnf* transcript containing exons VII, VIII, and IX) in the amygdala is summarized in Figure 2. According to two-way ANOVA, the *Treatment* factor significantly influenced the mRNA levels of *Bdnf*-tr.var.-6 in the amygdala of the rats [ $F(1, 29) = 4.526, p < 0.05$ ].

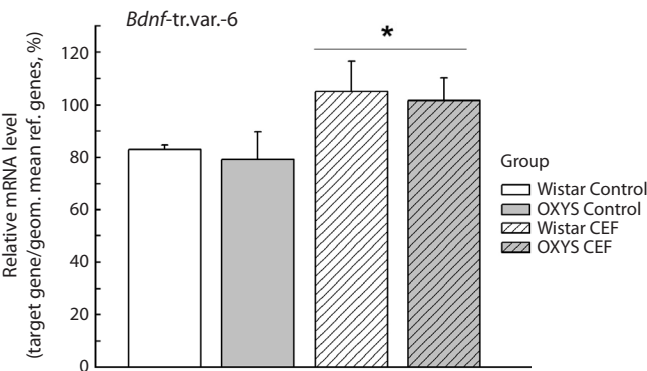
**Analysis of the enrichment of gene promoters in HDAC1 in the amygdala of OXYS rats.** In the analysis of the promoter region of *Mme* gene, the enrichment values for the target antibody against HDAC1 did not differ from the background values for the control IgG antibody according

<sup>4</sup> National Library of Medicine. NCBI\_Gene\_Bdnf brain-derived neurotrophic factor [Rattus norvegicus (Norway rat)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24225> (Accessed March, 20, 2026).  
<sup>5</sup> Santa Cruz Genome Browser. 2025. <http://genome.ucsc.edu/index.html> (Accessed October, 20, 2025).  
<sup>6</sup> National Library of Medicine. Primer-BLAST. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Accessed October, 20, 2025).



**Fig. 1.** Effects of CEF on *Bdnf*-tr.var.-5 mRNA levels in the amygdala of OXYS and Wistar rats.

Data are presented as a ratio (%) of target transcript mRNA levels to the geometric mean of *Gapdh* and *Hprt1* mRNA levels. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the values obtained in an independent group of animals ( $n = 4$  to 10 per group).

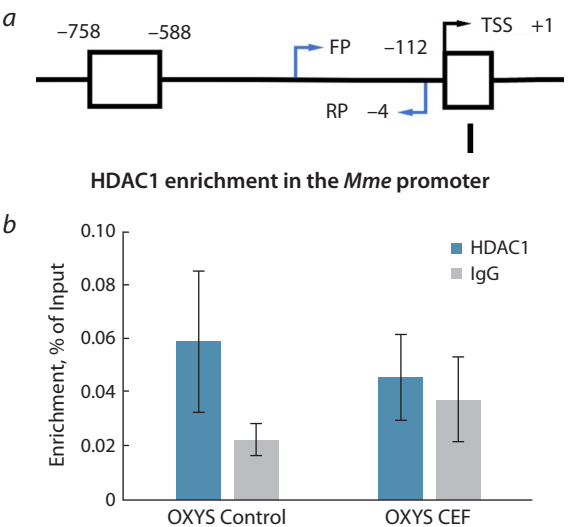


**Fig. 2.** Effects of CEF on *Bdnf*-tr.var.-6 mRNA levels in the amygdala of OXYS and Wistar rats.

The data are presented as a ratio (%) of target transcript mRNA levels to the geometric mean of *Gapdh* and *Hprt1* mRNA levels. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the values obtained in an independent group of animals ( $n = 5$  to 10 per group). Statistically significant differences: \*  $p < 0.05$  vs. Control (saline-treated) groups.

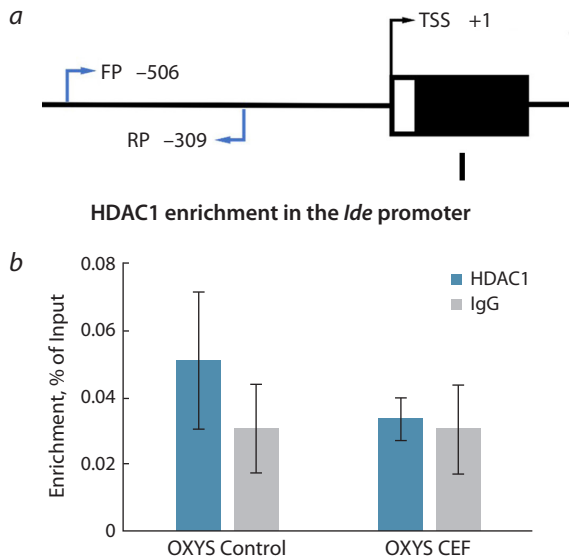
to the  $t$  test for independent samples in the Control group ( $t(8) = 1.35, p > 0.05$ ) or in the group of CEF-treated OXYS rats ( $t(8) = 0.36, p > 0.05$ ) (Fig. 3). Enrichment of the *Ide* promoter also did not differ from the background level in either control ( $t(8) = 0.84, p > 0.05$ ) or CEF-treated group ( $t(8) = 0.2, p > 0.05$ ) (Fig. 4).

We also focused on *Bdnf* promoter IV. According to previous reports, it is regulated by HDAC1 (Tran et al., 2015) and, accordingly, should be enriched in this protein. Indeed, the enrichment in HDAC1 in the Control group exceeded the background level by a factor of 8 ( $t(8) = 7.12, p < 0.001$ ). In the CEF-treated group, it was also significantly augmented ( $t(8) = 2.79, p < 0.05$ ), which motivated us to perform an intergroup comparison for target antibodies against HDAC1. The precipitation rates of the target DNA regions differed significantly between the groups ( $t(8) = 4.31, p < 0.01$ ). Hence, we infer that CEF affects the degree of HDAC1 enrichment in the *Bdnf* promoter IV in OXYS rats (Fig. 5).



**Fig. 3.** Effects of CEF on the enrichment of the *Mme* promoter in HDAC1 in the amygdala of OXYS rats.

(a) Loci that are homologous to primer sequences in the promoter region of the *Mme* gene are shown. (b) Quantitative results of enrichment in HDAC1 in the promoter region of the gene. Here and in Figures 4 and 5: TSS – Transcription Start Site; FP and RP – Forward and Reverse Primers. The distances (base pairs) from TSS are indicated. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the values obtained in an independent group of animals ( $n = 5$  per group).



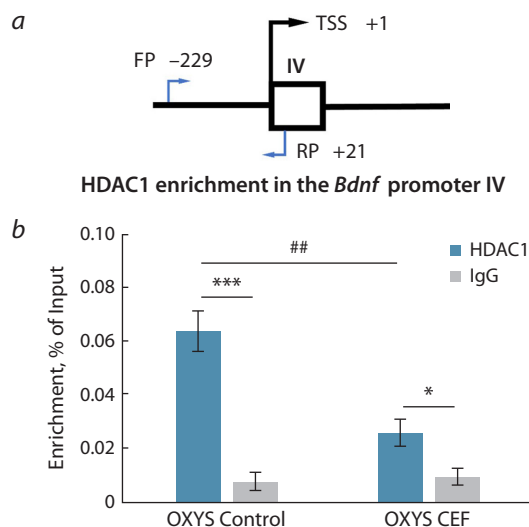
**Fig. 4.** Effects of CEF on enrichment in HDAC1 in the *Ide* promoter in the amygdala of OXYS rats.

(a) The annealing sites for the primers in the promoter region of the *Ide* gene are shown. (b) Quantitative results of enrichment in HDAC1 in the promoter region of the gene.

**Discussion**

It has been reported that CEF significantly affects *BDNF* expression in the brain. Moreover, CEF exerts a modulating effect on BDNF: it can augment (Kaur, Prakash, 2017; Gao et al., 2024; Cini et al., 2025) or attenuate (Alhaddad et al., 2020; Hammad et al., 2021) its increased levels in different models





**Fig. 5.** Effects of CEF on enrichment in HDAC1 in the *Bdnf* promoter IV in the amygdala of OXYS rats.

(a) The annealing sites for the primers in the promoter region of the *Bdnf* exon IV are shown. (b) Quantitative results of enrichment in HDAC1 in the promoter region of the gene. Statistically significant differences: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. corresponding IgG-treated samples; ## $p < 0.01$  vs. OXYS Control samples treated with antibodies against HDAC1.

of neuropathology. Typically, studies of *BDNF* expression address the levels of the protein-coding exon IX or mature protein. Here, we are the first to demonstrate the transcript-specific regulation of *BDNF* transcription by CEF. CEF significantly increased the levels of *Bdnf*-tr.var.-6 (containing exons VII, VIII, and IX) but not of *Bdnf*-tr.var.-5 (containing exons IV and IX) in the amygdala of OXYS rats. Noteworthy, despite the same final protein product, there are 10 validated transcripts of the rat *Bdnf* gene<sup>7</sup>, which are involved in different functions. For example, the selective activation of dendritic spines of neurons is based on the spatial segregation of different *BDNF* transcripts. Splice variants 1 and 4 control the architecture of proximal dendrites, whereas variants 2 and 6 regulate distal ones, which leads to differentiated and localized translation into the protein (Baj et al., 2011).

In contrast to the well-studied mechanisms of the antibacterial effect of CEF, its role in neuroprotection remains poorly understood. Although modulating effects of CEF on the expression of many genes in the brain are known, regulating pathways have been studied only for few. One of the known regulatory effects involves NF- $\kappa$ B-mediated activation of promoter of the gene encoding GLT-1 (Lee et al., 2008). However, further studies revealed that this mechanism could be structure-specific: in a rat model of cocaine abuse, CEF strongly upregulated GLT-1 both in the hippocampus and n. accumbens, whereas NF- $\kappa$ B involvement was found in the hippocampus but not in n. accumbens (Niedzielska-Andres et al., 2019). Here, we revealed for the first time a CEF effect on HDAC1 binding in a gene promoter. Indeed, CEF treatment significantly reduced HDAC1 enrichment at the *Bdnf* promoter IV in OXYS

rats. We suggest that this mechanism might be involved in the above-mentioned CEF effect on GLT-1 upregulation in n. accumbens in the rat model of cocaine abuse, as GLT-1 expression was initially suppressed in n. accumbens in rats vulnerable to rewarding effects of cocaine prior the CEF treatment (Niedzielska-Andres et al., 2019). At the same time, this novel epigenetic CEF effect could not be attributed to the CEF-induced upregulation of *Mme*, *Ide*, and *Bdnf* we studied here in OXYS rats.

No HDAC1-mediated effect of CEF on the *Mme* or *Ide* promoters was detected. Previously obtained results in a cell culture of rat primary cortical neurons revealed no interaction of HDAC1 with the *Mme* promoter either (Belyaev et al., 2009). Moreover, in that study, an inverse correlation between HDAC1 enrichment at the *MME* promoter and *MME* mRNA levels was found. In cell cultures with low *MME* mRNA levels (SH-SY5Y, HUVEC), HDAC1 enrichment was the highest. In contrast, in cell cultures with high *MME* / *Mme* mRNA levels (NB7, rat cortical neurons), the enrichment was low or null. We did not find reports on HDAC1 enrichment at *Ide* promoters in rats or rat cells. HDAC1 involvement was also shown in the regulation of *IDE* in human cell cultures. HDAC1 binding varied in cells overexpressing different splice variants of APP: HDAC1 enrichment was lower in cells overexpressing APP751 and APP770 than in cells injected with APP695 cDNA. *IDE* mRNA expression was higher in cells with longer APP isoforms, and this observation was consistent with the influence of HDAC1 (Nalivaeva et al., 2016). Noteworthy, untreated 5-month-old OXYS rats did not differ from control Wistar rats in the *Mme* or *Ide* mRNA levels in the amygdala (Tikhonova et al., 2018); therefore, the HDAC-mediated gene suppression that might be reverted by HDAC inhibition is unlikely.

In this study, we did not find significant differences between 5-month-old OXYS and Wistar rats in the levels of *Bdnf* mRNA (*Bdnf*-tr.var.5 and *Bdnf*-tr.var.6) in the amygdala. These results are consistent with previous findings about similar *Bdnf* mRNA levels in the frontal cortex and hippocampus in OXYS and Wistar rats at the age of 14 weeks (Alsallum et al., 2023). At the same time, we revealed the HDAC1 enrichment of promoter IV of the *Bdnf* gene in 5-month-old OXYS rats, although we observed no significant differences in the levels of *Bdnf*-tr.var.5 (the only *Bdnf* transcript containing exon IV in rats) in the amygdala between OXYS and Wistar rats of this age. As a rule, in younger proliferating cells, chromatin is in a less condensed state, which facilitates the access of the cellular transcriptional apparatus. On the contrary, aging cells are characterized by the appearance of densely packed heterochromatin organized into specific structures (Narita et al., 2003). In neurons, which are not prone to proliferation, markers of both active (H3K27Ac) and repressive (H3K27Me3) chromatin may be present, but in aging neurons of the murine hippocampus, a general decrease in acetylation and an increase in deacetylation are observed (Palomer et al., 2016). In the model of accelerated senescence and sporadic AD, enrichment of the *BDNF* promoter in HDACs seems to be anticipated. Chromatin of glial cells in OXYS rats at the age of 18 months has a high degree of condensation (Stefanova et al., 2015). We are unaware of the degree of enrichment of the *Bdnf* promoter in HDACs in the

<sup>7</sup> National Library of Medicine. NCBI\_Gene\_Bdnf brain-derived neurotrophic factor [Rattus norvegicus (Norway rat)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24225> (Accessed March, 20, 2026).



early postnatal period, but we could assume it from the state of chromatin in the brain of OXYS rats. For example, the size of the pyramidal neuron nucleus in the CA1 hippocampal area in OXYS rats decreases starting from the age of five months (Stefanova et al., 2014). Hence, we suggest that the activity of HDACs in the early postnatal period is low. With aging, this activity would increase. This is consistent with the present findings on the enrichment of the *Bdnf* promoter IV in HDAC1 in the amygdala of OXYS rats at the age of five months, when morphological changes in the neuron nuclei appear. Although this regulatory mechanism of gene transcription arises in 5-month-old OXYS rats, it seems to play a minor role at this age as no significant differences were found in the *Bdnf*-tr.var.5 levels in the amygdala between OXYS and Wistar rats or under the CEF treatment, which significantly reduced HDAC1 binding to the *Bdnf* promoter IV but did not change *Bdnf*-tr.var.5 levels in OXYS rats.

## Conclusions

The study of the mechanisms of chromatin remodeling through histone acetylation/deacetylation is of great interest for cognitive and behavioral neuroscience research. Moreover, dysregulation of histone acetylation pathways has been found in the hippocampus and frontal cortex of AD patients (Schueller et al., 2020), while HDAC inhibitors are considered potential drugs in the treatment of AD (Bondarev et al., 2021). Here, we disclosed a novel mechanism of transcription regulation by CEF in the brain related to the inhibition of the HDAC1 enrichment of a gene promoter, which might underlie its neuroprotective activity. However, in 5-month-old OXYS rats, a rat model of sporadic AD, it seems to play a minor role at this age, as CEF treatment significantly reduced HDAC1 binding to *Bdnf* promoter IV but did not change *Bdnf*-tr.var.5 (the only *Bdnf* transcript containing exon IV in rats) levels in the amygdala in OXYS rats. We are also the first to demonstrate the transcript-specific regulation of *BDNF* transcription by CEF. CEF significantly increased the levels of *Bdnf*-tr.var.-6 (containing exons VII, VIII, and IX) but not of *Bdnf*-tr.var.-5 in the amygdala of OXYS rats. The results of the study can be taken into account and used in AD treatment and the correction of cognitive deficits in neurodegenerative diseases.

## References

- Alhaddad H., Alasmari F., Alhamadani B., Wong W., Bell R.L., Sari Y. Effects of chronic ethanol consumption on the expression of GLT-1 and neuroplasticity-related proteins in the nucleus accumbens of alcohol-preferring rats. *Brain Res Bull.* 2020;165:272-280. doi 10.1016/j.brainresbull.2020.10.012
- Alsallum M., Kaminskaya Y.P., Tsybko A., Kolosova N., Naumenko V. Patterns of expression of the key genes of the BDNF system and serotonin receptors in the brain of OXYS rats in the development of the signs of Alzheimer's disease. *Adv Gerontol.* 2023;13(2):84-93. doi 10.1134/S207905702360026X
- Baj G., Leone E., Chao M.V., Tongiorgi E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(40):16813-16818. doi 10.1073/pnas.1014168108
- Belichenko V.M., Bashirzade A.A., Tenditnik M.V., Dubrovina N.I., Akopyan A.A., Ovsyukova M.V., Fedoseeva L.A., Pupyshev A.B., Aftanas L.I., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Comparative

- analysis of early neurodegeneration signs in a mouse model of Alzheimer's disease-like pathology induced by two types of the central (Intracerebroventricular vs. Intrahippocampal) administration of A $\beta$ <sub>25-35</sub> oligomers. *Behav Brain Res.* 2023;454:114651. doi 10.1016/j.bbr.2023.114651
- Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J. Nepri-lysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 2009;10(1):94-100. doi 10.1038/embor.2008.222
- Bondarev A.D., Attwood M.M., Jonsson J., Chubarev V.N., Tarasov V.V., Schioth H.B. Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(12):4577-4597. doi 10.1111/bcp.14889
- Cini N., Atasoy O., Uyanikgil Y., Yaprak G., Erdogan M.A., Erbas O. Ceftriaxone has a neuroprotective effect in a whole-brain irradiation-induced neurotoxicity model by increasing GLT-1 and reducing oxidative stress. *Strahlenther Onkol.* 2025;201(9):903-919. doi 10.1007/s00066-025-02405-z
- Cudkowicz M.E., Titus S., Kearney M., Yu H., Sherman A., Schoenfeld D., Hayden D., ... Simpson E., Tolkoﬀ-Rubin N., Zinman L., Shefner J.M.; Ceftriaxone Study Investigators. Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2014;13(11):1083-1091. doi 10.1016/S1474-4422(14)70222-4
- Du Y., Wu H.T., Qin X.Y., Cao C., Liu Y., Cao Z.Z., Cheng Y. Post-mortem brain, cerebrospinal fluid, and blood neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *J Mol Neurosci.* 2018;65(3):289-300. doi 10.1007/s12031-018-1100-8
- Gao R., Ali T., Liu Z., Li A., Hao L., He L., Yu X., Li S. Ceftriaxone averts neuroinflammation and relieves depressive-like behaviors via GLT-1/TrkB signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024;701:149550. doi 10.1016/j.bbrc.2024.149550
- Ginzinger D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002;30(6):503-512. doi 10.1016/s0301-472x(02)00806-8
- Hammad A.M., Swiss G.M.S., Hall F.S., Hikmat S., Sari Y., Al-Qirim T.M., Amawi H.A. Ceftriaxone reduces waterpipe tobacco smoke withdrawal-induced anxiety in rats via modulating the expression of TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B, Nrf2, and GLT-1. *Neuroscience.* 2021;463:128-142. doi 10.1016/j.neuroscience.2021.03.030
- Hefendehl J.K., LeDue J., Ko R.W., Mahler J., Murphy T.H., MacVicar B.A. Mapping synaptic glutamate transporter dysfunction in vivo to regions surrounding A $\beta$  plaques by iGluSnFR two-photon imaging. *Nat Commun.* 2016;7:13441. doi 10.1038/ncomms13441
- Idda M.L., Munk R., Abdelmohsen K., Gorospe M. Noncoding RNAs in Alzheimer's disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(2):10. doi 10.1002/wrna.1463
- Kaur B., Prakash A. Ceftriaxone attenuates glutamate-mediated neuroinflammation and restores BDNF in MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Pathophysiology.* 2017;24(2):71-79. doi 10.1016/j.pathophys.2017.02.001
- Kumari S., Deshmukh R.  $\beta$ -lactam antibiotics to tame down molecular pathways of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2021;895:173877. doi 10.1016/j.ejphar.2021.173877
- Kurochkin I.V., Guarnera E., Berezovsky I.N. Insulin-degrading enzyme in the fight against Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(1):49-58. doi 10.1016/j.tips.2017.10.008
- Lee S.G., Su Z.Z., Emdad L., Gupta P., Sarkar D., Borjabad A., Vol-sky D.J., Fisher P.B. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13116-13123. doi 10.1074/jbc.M707697200
- Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Turner A.J. New insights into epigenetic and pharmacological regulation of amyloid-degrading enzymes. *Neurochem Res.* 2016;41(3):620-630. doi 10.1007/s11064-015-1703-1

- Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A., Turner A.J. Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mech Ageing Dev.* 2020;192:111363. doi 10.1016/j.mad.2020.111363
- Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., Lowe S.W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003;113(6):703-716. doi 10.1016/s0092-8674(03)00401-x
- Ng T.K.S., Ho C.S.H., Tam W.W.S., Kua E.H., Ho R.C. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD): A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):257. doi 10.3390/ijms20020257
- Niedzielska-Andres E., Mizera J., Sadakierska-Chudy A., Pomierny-Chamiolo L., Filip M. Changes in the glutamate biomarker expression in rats vulnerable or resistant to the rewarding effects of cocaine and their reversal by ceftriaxone. *Behav Brain Res.* 2019;370:111945. doi 10.1016/j.bbr.2019.111945
- Nikolac Perkovic M., Videtic Paska A., Konjevod M., Kouter K., Svob Strac D., Nedic Erjavec G., Pivac N. Epigenetics of Alzheimer's disease. *Biomolecules.* 2021;11(2):195. doi 10.3390/biom11020195
- Palomer E., Martin-Segura A., Baliyan S., Ahmed T., Balschun D., Venero C., Martin M.G., Dotti C.G. Aging triggers a repressive chromatin state at *Bdnf* promoters in hippocampal neurons. *Cell Rep.* 2016;16(11):2889-2900. doi 10.1016/j.celrep.2016.08.028
- Poon C.H., Tse L.S.R., Lim L.W. DNA methylation in the pathology of Alzheimer's disease: from gene to cognition. *Ann N Y Acad Sci.* 2020;1475(1):15-33. doi 10.1111/nyas.14373
- Ramazi S., Allahverdi A., Zahir J. Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. *J Biosci.* 2020;45(1):135
- Rasero J., Alonso-Montes C., Diez I., Olabarrieta-Landa L., Remaki L., Escudero I., Mateos B., Bonifazi P., Fernandez M., Arango-Lasprilla J.C., Stramaglia S., Cortes J.M. Group-level progressive alterations in brain connectivity patterns revealed by diffusion-tensor brain networks across severity stages in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:215. doi 10.3389/fnagi.2017.00215
- Ratti E., Berry J.D., Greenblatt D.J., Loci L., Ellrodt A.S., Shefner J.M., Cudkovic M.E. Preclinical rodent toxicity studies for long term use of ceftriaxone. *Toxicol Rep.* 2015;2:1396-1403. doi 10.1016/j.toxrep.2015.09.010
- Rudnitskaya E.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Impact of changes in neurotrophic supplementation on development of Alzheimer's disease-like pathology in Oxy rats. *Biochemistry (Mosc).* 2017;82(3):318-329. doi 10.1134/S0006297917030105
- Sada N., Fujita Y., Mizuta N., Ueno M., Furukawa T., Yamashita T. Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. *Cell Death Dis.* 2020;11(8):655. doi 10.1038/s41419-020-02897-w
- Schueler E., Paiva I., Blanc F., Wang X.L., Cassel J.C., Boutillier A.L., Bousiges O. Dysregulation of histone acetylation pathways in hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2020;33:101-116. doi 10.1016/j.euroneuro.2020.01.015
- Shvedunova M., Akhtar A. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(5):329-349. doi 10.1038/s41580-021-00441-y
- Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korbolina E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. *Cell Cycle.* 2014;13(6):898-909. doi 10.4161/cc.28255
- Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Kiseleva E., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology. *J Pineal Res.* 2015;59(2):163-177. doi 10.1111/jpi.12248
- Tikhonova M.A., Ho S.C., Akopyan A.A., Kolosova N.G., Weng J.C., Meng W.Y., Lin C.L., Amstislavskaya T.G., Ho Y.J. Neuroprotective effects of ceftriaxone treatment on cognitive and neuronal deficits in a rat model of accelerated senescence. *Behav Brain Res.* 2017;330:8-16. doi 10.1016/j.bbr.2017.05.002
- Tikhonova M.A., Amstislavskaya T.G., Belichenko V.M., Fedoseeva L.A., Kovalenko S.P., Pisareva E.E., Avdeeva A.S., Kolosova N.G., Belyaev N.D., Aftanas L.I. Modulation of the expression of genes related to the system of amyloid-beta metabolism in the brain as a novel mechanism of ceftriaxone neuroprotective properties. *BMC Neurosci.* 2018;19(Suppl. 1):13. doi 10.1186/s12868-018-0412-5
- Tikhonova M.A., Amstislavskaya T.G., Ho Y.J., Akopyan A.A., Tenednik M.V., Ovsyukova M.V., Bashirzade A.A., Dubrovina N.I., Aftanas L.I. Neuroprotective effects of ceftriaxone involve the reduction of A $\beta$  burden and neuroinflammatory response in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2021;15:736786. doi 10.3389/fnins.2021.736786
- Tran P.V., Kennedy B.C., Lien Y.C., Simmons R.A., Georgieff M.K. Fetal iron deficiency induces chromatin remodeling at the *Bdnf* locus in adult rat hippocampus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;308(4):R276-R282. doi 10.1152/ajpregu.00429.2014
- Zhang Y., Chen H., Li R., Sterling K., Song W. Amyloid  $\beta$ -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):248. doi 10.1038/s41392-023-01484-7
- Zuccato C., Belyaev N., Conforti P., Ooi L., Tartari M., Papadimou E., MacDonald M., Fossale E., Zeitlin S., Buckley N., Cattaneo E. Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci.* 2007;27(26):6972-6983. doi 10.1523/JNEUROSCI.4278-06.2007
- Zumkehr J., Rodriguez-Ortiz C.J., Cheng D., Kieu Z., Wai T., Hawkins C., Kilian J., Lim S.L., Medeiros R., Kitazawa M. Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2015;36(7):2260-2271. doi 10.1016/j.neurobiolaging.2015.04.005

**Declaration of competing interest.** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Received October 21, 2025. Revised May 14, 2026. Accepted May 25, 2026.

doi 10.18699/vjgb-26-92

## Влияние мутантных генов *APP* и *PSEN1* на асимметрию гиппокампа у мышей 5xFAD – трансгенной модели болезни Альцгеймера

Е.Ю. Брусенцев , И.Н. Рожкова<sup>1</sup>, В.С. Козенева<sup>1, 2</sup>, И.Д. Чекашов , Т.А. Рахманова<sup>1, 2</sup>,  
О.Б. Шевелев<sup>1</sup>, С.Я. Амтиславский  

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 amstis@yandex.ru

**Аннотация.** Болезнь Альцгеймера (БА) – возрастная нейродегенеративная патология, а также одна из главных причин деменции с расстройством памяти и когнитивных функций. Важнейшую роль в процессе обучения и кодирования памяти играет зубчатая извилина гиппокампа (dentate gyrus, DG), которая подвергается существенным изменениям при БА. Для изучения механизмов, лежащих в основе БА, и тестирования новых терапевтических средств, создают модели этой патологии на мышах. Одной из наиболее популярных и актуальных моделей для исследования БА является трансгенная линия мышей 5xFAD с мутантными генами человека, а именно предшественника бета-амилоида (*APP*) и пресенилина-1 (*PSEN1*). Целью данной работы стало исследование влияния мутантных трансгенов *APP* и *PSEN1* на микроструктуру DG гиппокампа у гетерозиготных самцов мышей трансгенной линии 5xFAD в возрасте 6 месяцев при помощи магнитно-резонансной томографии с диффузионно-тензорной визуализацией в сочетании с иммуногистохимическим анализом. Особый акцент был сделан и на оценке асимметрии гиппокампа, что ранее на мышах 5xFAD не исследовали. В DG гиппокампа обоих полушарий самцов мышей 5xFAD выявлены повышенное содержание бета-амилоида по сравнению с контрольной группой дикого типа в сочетании с более высокой плотностью микроглии, но отсутствие различий по уровню нейрогенеза. Наряду с этим обнаружена асимметрия гиппокампа у самцов мышей 5xFAD, проявляющаяся в увеличении объема правого гиппокампа и снижении уровня фракционной анизотропии в DG правого гиппокампа, а также в уменьшении плотности нейронов в DG с левой стороны по сравнению с диким типом. Исходя из полученных нами результатов, можно сделать заключение, что мутантные гены *APP* и *PSEN1* человека вызывают изменение в DG гиппокампа, что может открыть новые возможности ранней диагностики болезни Альцгеймера. Выявленные нами изменения объема гиппокампа и его асимметрия могут стать важными биомаркерами, характеризующими данную патологию.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера; трансгенные мыши 5xFAD; гены *APP* и *PSEN1*; гиппокамп; зубчатая извилина; диффузионно-тензорная визуализация; иммуногистохимия; нейровоспаление; бета-амилоид; нейрогенез

**Для цитирования:** Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Козенева В.С., Чекашов И.Д., Рахманова Т.А., Шевелев О.Б., Амтиславский С.Я. Влияние мутантных генов *APP* и *PSEN1* на асимметрию гиппокампа у мышей 5xFAD – трансгенной модели болезни Альцгеймера. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):908-920. doi 10.18699/vjgb-26-92

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке РНФ (№ 25-24-00153).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН и Институту биомедицины (МБФ) Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

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

## The influence of mutant genes *APP* and *PSEN1* on hippocampal asymmetry in 5xFAD mice, transgenic model of Alzheimer disease

E.Yu. Brusentsev , I.N. Rozhkova<sup>1</sup>, V.S. Kozeneva<sup>1, 2</sup>, I.D. Chekashov , T.A. Rakhmanova<sup>1, 2</sup>,  
O.B. Shevelev<sup>1</sup>, S.Ya. Amstislavsky  

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 amstis@yandex.ru



**Abstract.** Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative pathology and one of the primary causes of dementia associated with memory and cognitive impairment. The dentate gyrus (DG) of the hippocampus plays a crucial role in learning and memory encoding, and it undergoes significant changes in AD. To study the underlying mechanisms of AD and to test new therapeutic agents, mouse models of this pathology are developed. One of the most popular and relevant models for AD research is the 5xFAD transgenic mouse strain carrying mutant human genes, specifically: amyloid beta precursor protein (*APP*) and presenilin-1 (*PSEN1*). The aim of this study was to investigate the influence of mutant *APP* and *PSEN1* transgenes on the microstructure of the hippocampal DG in six-month-old heterozygous male 5xFAD transgenic mice using diffusion tensor magnetic resonance imaging (DTI-MRI) combined with immunohistochemical analysis. A special emphasis was placed on assessing hippocampal asymmetry, which had not been previously investigated in 5xFAD mice. In the hippocampal DG of both hemispheres in male 5xFAD mice, an elevated level of beta-amyloid was detected compared to the wild-type control group, combined with a higher density of microglia, but no differences were found in the level of neurogenesis. Along with this, hippocampal asymmetry was discovered in male 5xFAD mice, manifesting as an increased volume of the right hippocampus, a decreased level of fractional anisotropy in the right hippocampal DG, and a reduced neuron density in the left DG compared to the wild-type. Based on our results, it can be concluded that mutant human *APP* and *PSEN1* genes cause alterations in the hippocampal DG, which may open new possibilities for the early diagnosis of Alzheimer's disease. The identified changes in hippocampal volume and its asymmetry could become important biomarkers characterizing this pathology.

**Key words:** Alzheimer's disease; 5xFAD transgenic mice; *APP* and *PSEN1* genes; hippocampus; dentate gyrus; diffusion tensor imaging; immunohistochemistry; neuroinflammation; beta-amyloid; neurogenesis

**For citation:** Brusentsev E.Yu., Rozhkova I.N., Kozeneva V.S., Chekashov I.D., Rakhmanova T.A., Shevelev O.B., Amstislavsky S.Ya. The influence of mutant genes *APP* and *PSEN1* on hippocampal asymmetry in 5xFAD mice, transgenic model of Alzheimer disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):908-920. doi 10.18699/vjgb-26-92

## Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является возрастной патологией и одной из главных причин деменции с расстройством памяти и когнитивных функций (Bermejo-Pareja, Del Ser, 2024; Nasb et al., 2024; Perneczky et al., 2024). Для БА человека характерно аномальное накопление внеклеточного бета-амилоида и внутриклеточного гиперфосфорилированного тау-белка (Koss et al., 2016; Wang L. et al., 2016; Nasb et al., 2024). Генетические исследования показали, что данные изменения в головном мозге, предшествующие деменции и другим симптомам БА, могут быть связаны с мутациями в гене, кодирующем предшественник бета-амилоида (amyloid precursor protein, *APP*), и в гене, кодирующем пресенилин-1 (presenilin-1, *PSEN1*) (De Strooper et al., 2012; Pink et al., 2012; Petit et al., 2022). Образование бляшек бета-амилоида, начинающееся за годы до основных клинических симптомов, считается одним из ранних признаков развития патологии (Bloom, 2014; Bermejo-Pareja, Del Ser, 2024). Накопление бета-амилоида, а также вызванное им нейровоспаление в ЦНС – важные биомаркеры как для мониторинга развития БА (Adlard et al., 2014; Long, Holtzman, 2019; Perneczky et al., 2024), так и для отслеживания результатов терапевтических воздействий, направленных на смягчение этого заболевания (Perneczky et al., 2024).

Методы объемной магнитно-резонансной томографии (МРТ) выявляют функциональные и структурные нарушения головного мозга, в том числе у больных БА (Roe et al., 2021; Wang C. et al., 2022; Ai et al., 2025). Характерный признак БА – это нарушение целостности волокон белого вещества головного мозга, что выявлено при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) с диффузионно-тензорной визуализацией (ДТВ-МРТ) (Rose et al., 2000). Метод ДТВ-МРТ – более чувствительный по сравнению с объемной магнитно-резонансной томографией и широко

используется для обнаружения микроструктурных изменений головного мозга, в частности для оценки целостности белого вещества (Rose et al., 2000; Wang N. et al., 2019; Harrison et al., 2020; Veale et al., 2021).

Ранее с помощью ДТВ-МРТ обнаружено снижение фракционной анизотропии (ФА) в некоторых областях головного мозга людей, страдающих БА, в частности в мозолистом теле, медиальной и височной долях, своде, поясной извилине, предклинье и белом веществе префронтальной коры (Teipel et al., 2012). ДТВ-МРТ использовали для выявления микроструктурных изменений в отдельных областях гиппокампа (Beaujoin et al., 2018; Shih et al., 2023). Анализ этих работ позволяет утверждать, что данный метод перспективен для раннего обнаружения и мониторинга изменений в отдельных структурах мозга при болезни Альцгеймера.

Для изучения механизмов развития патологии и тестирования лекарственных препаратов, предназначенных для лечения БА, используют животные модели этого заболевания (Jankowsky, Zheng, 2017; Sasaguri et al., 2017). В частности, одной из наиболее популярных моделей являются трансгенные мыши 5xFAD (Research Models 5xFAD (C57BL6)), созданные в Джексонской лаборатории (США) на основе линии C57BL/6. У мышей 5xFAD экспрессируется человеческий ген *APP* (с мутациями K670N/M671L, I716V и V717I) и *PSEN1* (с мутациями M146L и L286V) (Oakley et al., 2006; Oblak et al., 2021). Ранее с использованием марганец-усиленной МРТ было показано, что мутантные гены *APP* и *PSEN1* человека вызывают изменение региональной активности головного мозга мышей линии 5xFAD (Tang et al., 2016; Nie et al., 2019), а применение ДТВ-МРТ позволило выявить более высокую характерную длину пути во взвешенных структурных и функциональных элементах коннектома при минимальной плотности (Kesler et al., 2018).



Мутантные гены *APP* и *PSEN1* человека вызывают различные отклонения в головном мозге у трансгенных мышей 5xFAD в зависимости от гомозиготности/гетерозиготности линии (Richard et al., 2015). Предшественник бета-амилоида в пирамидных нейронах у гомозиготных мышей 5xFAD образуется уже в возрасте 16 дней, а к возрасту 1.5 мес. накапливается внутринейрональный бета-амилоид, однако у гетерозиготных мышей 5xFAD бета-амилоид обнаруживают в более позднем возрасте (Richard et al., 2015).

Наряду с накоплением бета-амилоида мутантные гены *APP* и *PSEN1* человека вызывают у трансгенных мышей 5xFAD аномалии миелиновых оболочек нейронов мозга, причем эти патологические изменения нарастают по мере старения животных (Gu et al., 2018). Нарушение миелинизации нервных волокон – важнейший маркер БА, обнаруживаемый, в частности, с помощью методов МРТ уже на начальных стадиях заболевания, является значимым патофизиологическим фактором этой патологии (Butt et al., 2019; Bermejo-Pareja, Del Ser, 2024).

Гиппокамп – это отдел мозга, играющий важную роль в различных процессах, в том числе в обучении, а также в формировании и консолидации памяти, претерпевает значительные структурные, морфологические и электрофизиологические изменения в процессе старения и при нейродегенеративных заболеваниях, таких как БА (Padurariu et al., 2012; Bartsch, Wulff, 2015). У пациентов с ранними симптомами БА выявлена атрофия зубчатой извилины гиппокампа, что указывает на роль этой структуры головного мозга в развитии данной патологии (Hari et al., 2024).

На сегодняшний день в работах по исследованию зубчатой извилины гиппокампа мышей 5xFAD не учитывали асимметрию полушарий (Giannoni et al., 2016; Kantarci et al., 2020; Nairuz et al., 2024; Zhu, Liu, 2025). Цель настоящей работы – исследование влияния мутантных генов *APP* и *PSEN1* человека на микроструктуру зубчатой извилины (dentate gyrus, DG) гиппокампа, а также оценка асимметрии гиппокампа у гетерозиготных мышей трансгенной линии 5xFAD при помощи ДТВ-МРТ и иммуногистохимии.

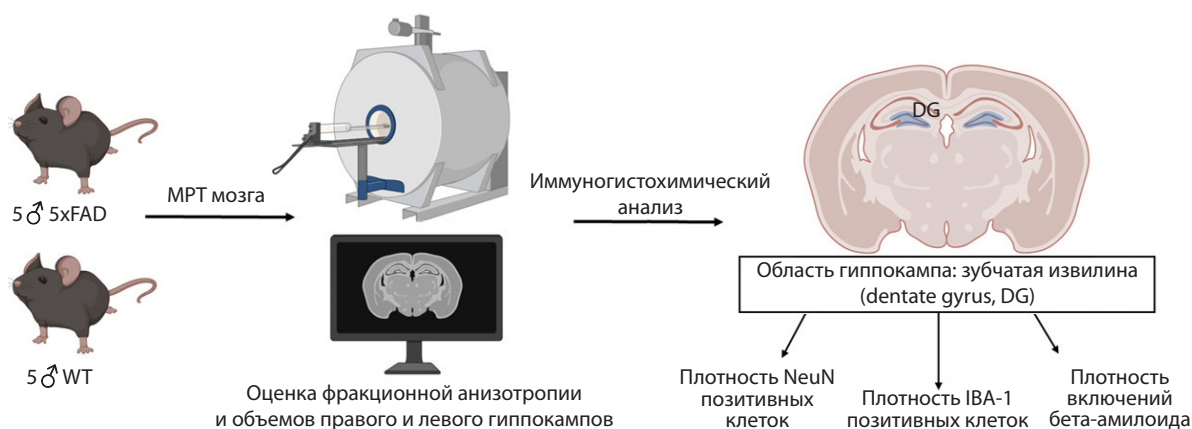
## Материалы и методы

**Животные.** В эксперименте исследовано пять самцов 5xFAD (гетерозиготные мыши, моделирующие БА) и пять самцов дикого типа (wild type, WT). Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (AnimalCare, США) размером  $34.3 \times 29.2 \times 15.5$  см, при температуре 22–24 °C и влажности 40–50 %, с инвертированным 12:12-часовым циклом дня-ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстилки использовали березовую щепу, фракционную для содержания лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Животные имели постоянный доступ к автоклавированному стандартизированному комбикорму для лабораторных крыс и мышей «Дельта Фидс» Л6К 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 («БиоПро», Россия) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками.

**Графический дизайн эксперимента** представлен на рис. 1.

**Диффузионно-тензорная магнитно-резонансная томография.** Оценка анатомии головного мозга, а также непрерывности и плотности нервных волокон в гиппокампе у мышей линий 5xFAD и WT проведена при помощи МРТ по протоколам, описанным ранее (Naumenko et al., 2018; Lipengolts et al., 2022; Zhang C. et al., 2023). Мыши были наркотизированы с использованием смеси кислорода с изофлюраном (98.5/1.5 %), после этого помещены в МР-томограф на специализированной платформе. Перед проведением исследования на томографе каждое животное фиксировали на специальной подставке, после чего устанавливали датчик дыхания для контроля глубины наркоза.

Магнитно-резонансную томографию проводили в течение 20–30 мин для каждого животного на экспериментальном томографе для малых животных ClinScan (BrukerBioSpin, Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл, с использованием объемной катушки для головы мыши и следующих импульсных последовательностей: 1) быстрые T1-взвешенные изображения на основе импульсной последовательности градиентного эха в трех ортогональных плоскостях, минимум три раза или до полу-



**Рис. 1.** Графический дизайн эксперимента.

WT – wild type.

чения правильных анатомических срезов через срединные структуры головного мозга для последующего позиционирования срезов основных импульсных последовательностей; 2) диффузионно-взвешенная импульсная последовательность с *b*-factor 0 и 1200 с/мм<sup>2</sup>, количество диффузионных направлений 64, TE = 32 мс, TR = 8000 мс, 4 усреднения, размер вокселя 0.163542 × 0.163542 × 0.8 мм<sup>3</sup> (FOV = 13 × 15 мм) без межсрезового промежутка и изображения с тем же разрешением, *b*-factor 0 с/мм<sup>2</sup> и разворотом фазокодирующего градиента на 180 градусов; 3) анатомические T2-взвешенные изображения с параметрами: TE = 80 мс, TR = 3430 мс, ETL = 14, размер вокселя 0.083 × 0.083 × 0.8 мм<sup>3</sup> (FOV = 16 × 16 мм) без межсрезового промежутка.

Обработку полученных данных производили в программном пакете DSI-Studio по следующим этапам: 1) конвертация данных в формат NIfTI (Neuroimaging Informatics Technology Initiative); 2) коррекция неоднородности TOPUP и EDDY; 3) коррекция двигательных артефактов; 4) реконструкция данных двумя способами: Generalized q-sampling imaging, GQI (Yeh et al., 2010) и Q-space diffeomorphic reconstruction, QSDR (Yeh, Tseng, 2011). Для GQI производили интерполяцию до изотропного вокселя 0.1635 и реконструкцию с сохранением оригинальной пространственной ориентации. Для QSDR проводили выравнивание пространственной ориентации изображений, реконструкцию к мышинному атласу с изотропным вокселем 0.1630; 5) экспорт карт фракционной анизотропии; 6) загрузка атласа DukeRCCF (Johnson et al., 2022) и карт в скрипт на Python; 7) расчет медианы, первого и третьего квартиля в зонах по выбранному атласу через его регистрацию на полученные карты ФА двумя способами, QI и QSDR.

**Оценка объема гиппокампа.** Объемы правой и левой частей гиппокампа рассчитывали как сумму площадей структур на срезах мозга, полученных на T2-взвешенных изображениях, умноженную на толщину среза, с использованием программы ImageJ (Запара и др., 2018).

**Интракардиальная перфузия.** Перфузию осуществляли через систему кровообращения для фиксации тканей головного мозга, как описано ранее (Рожкова и др., 2023). Сразу после окончания МРТ мышей наркотизировали, вводя им внутримышечно 75 мкл (на 10 г массы тела) медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; «Апи-Сан», Россия) и 60 мкл (на 10 г массы тела) Золетила (Virbac, Франция). Далее вводили через кровеносную систему 30–50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 30–50 мл 10 % раствора формалина, приготовленного на PBS. После этого мозг извлекали и хранили в 30 % растворе сахарозы, приготовленном на основе PBS с добавлением 10 % формалина, при 4 °C для обезвоживания и последующей фиксации в течение следующих 2 недель, пока материал не опустится на дно колбы. Образцы мозга погружали в Tissue-Tek O.C.T. (SakuraFinetek, США), затем замораживали и хранили при –70 °C.

**Приготовление замороженных срезов мозга.** В соответствии с координатами атласа (Paxinos et al., 2012) делали замороженные срезы левого и правого гиппокампа

(включая зубчатую извилину, dentate gyrus) на расстоянии –1.46 (–1.82) мм от брегмы. Срезы толщиной 20 мкм готовили при –25 °C на криотоме HM550 OP (Thermo Fisher Scientific, США) и помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием PCI, со шлифованной кромкой и колорированным краем (CITOTEST, Китай).

**Иммуногистохимическое окрашивание** образцов выполняли по протоколам производителей наборов с небольшими модификациями (Рожкова и др., 2023). Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей гидратацией в течение 5 мин в PBS. Затем после регидратации в 10 mM щелочно-цитратного буфера (pH = 9) при 95 °C на водяной бане TW-2.02 (Elmi, Латвия) в течение 10 мин проводили индуцированную нагреванием демаскировку эпитопов. После этого срезы извлекали из буфера и охлаждали до комнатной температуры. Затем образцы трижды промывали в буфере PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1 % Tween-20 P9416-100ML (Merck, Германия). Далее в каждую секцию на 30 мин добавляли ProteinBlock (ab64226; Abcam, Великобритания), а затем удаляли лишнюю жидкость в соответствии с рекомендацией производителя. После этого добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при 4 °C во влажной темной камере.

Используемые концентрации антител составляли 1:750 для anti-NeuN (ab177487, Abcam), 1:500 для AIF1/IBA1 Rabbit mAb (A19776, ABclonal, Германия), 1:500 для β-Amyloid-(1-42) Rabbit mAb (A24422, ABclonal) и 1:750 для anti-DCX (ab18723, Abcam). Затем срезы промывали буфером PBS-Tween, удаляли лишнюю жидкость, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG & LAF488 (ab150077, Abcam) в концентрации 1:650 и оставляли во влажной среде в темной камере на 2 ч при 4 °C. После этого образцы промывали буфером PBS-Tween, удаляли излишки жидкости и монтировали на предметные стекла в среде ProLong, Glass Antifade Mountant (Thermo P36982, Thermo Fisher Scientific).

С целью идентификации ядер нейронов к срезам, окрашенным антителами AIF1/IBA1 Rabbit mAb и β-Amyloid-(1-42) Rabbit mAb, дополнительно добавляли 80 мкл DAPI (Thermo Fisher Scientific) в концентрации 2 мг/мл, оставляли в темной влажной камере (15 мин) и затем дважды промывали в PBS (3 мин) перед нанесением среды ProLong, Glass Antifade Mountant.

**Анализ плотности меченных антителами нейронов DG** области гиппокампа проводили с помощью прямого флуоресцентного микроскопа ZEISS AxioImager 2 (Carl Zeiss, Германия). Вычисляли среднее число клеток, меченных антителами, в интересующей области минимум с четырех срезов для каждого животного. Оценку числа гранулярных и DCX позитивных клеток осуществляли в гранулярном слое DG. Бета-амилоидные включения и IBA1 позитивные клетки подсчитывали сразу в двух слоях DG – гранулярном и полиморфном. Для оценки плотности DCX позитивных клеток, бета-амилоидных включений и IBA1 позитивных клеток использовали поле зрения, соответствующее размеру изучаемой области, для оценки плотности нейронов, позитивных NeuN, – минимум три

поля зрения (2000 мкм<sup>2</sup>) на одном изображении (Zhang L. et al., 2021). Для создания поля зрения использовали программу ImageJ. Плотность (миллионов клеток,  $n \times 10^5$ ) в объеме (мм<sup>3</sup>) рассчитывали, исходя из среднего числа клеток в области, как описано ранее (Рожкова и др., 2023).

**Статистический анализ** результатов проводили с помощью программы STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с применением W-критерия Шапиро–Уилка. Для оценки влияния фактора «асимметрия полушарий» на уровень фракционной анизотропии, объемы гиппокампов, а также плотность нейронов, микроглии, DCX и включений бета-амилоида в зубчатой извилине гиппокампа использовали критерий Уилкоксона (Wilcoxon signed-rank test) с последующим попарным сравнением между группами разного генотипа с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для оценки плотности нейронов, микроглии, DCX и включений бета-амилоида дополнительно применяли H-критерий Краскела–Уоллиса для сравнения по фактору «генотип». Данные представлены как медиана с первым и третьим квартилями – Me [Q1; Q3]. За уровень значимости принимали  $p < 0.05$ .

## Результаты

Данные по объему гиппокампа представлены на рис. 2. Статистический анализ при помощи критерия Уилкоксона не показал влияния фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 23$ ;  $p > 0.05$ ] на данный параметр. Тем не менее U-критерий Манна–Уитни показал влияние фактора «генотип» ( $U = 1$ ;  $|Z| = 2.30$ ;  $p < 0.05$ ), в частности, достоверно больший объем гиппокампа у мышей 5xFAD, чем у WT (13.599 [13.583; 14.834] против 12.445 [11.556; 12.622] мкл<sup>3</sup> соответственно) в правом полушарии головного мозга.

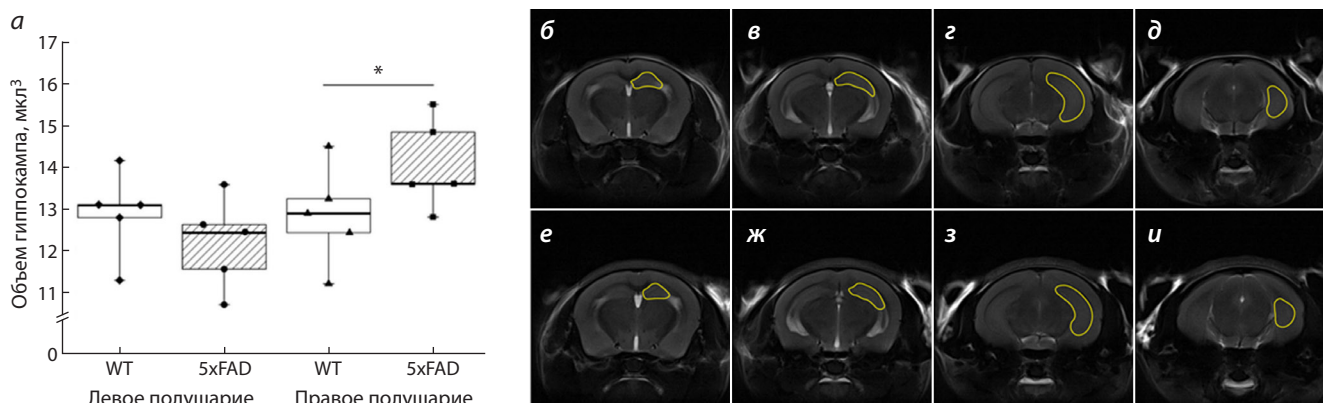
Данные по ФА в DG гиппокампа представлены на рис. 3. Критерий Вилкоксона показал значимое влияние фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 2$ ;  $p < 0.01$ ] на ФА в DG зоне гиппокампа. Сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни показало влияние фактора «генотип» на уровень ФА

( $U = 2$ ;  $|Z| = 2.09$ ;  $p < 0.05$ ) в DG зоне гиппокампа, ФА был меньше с правой стороны у мышей 5xFAD по сравнению с контрольными мышами WT (0.106 [0.010; 0.115] против 0.126 [0.124; 0.143] соответственно) (см. рис. 3, а).

Статистический анализ при помощи критерия Вилкоксона показал влияние фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 5$ ;  $p < 0.05$ ] на ФА в гранулярном слое DG зоны гиппокампа. Однако сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни не выявило влияния фактора «генотип» как для левого полушария ( $U = 10$ ;  $|Z| = 0.42$ ;  $p > 0.05$ ), так и для правого полушария ( $U = 3$ ;  $|Z| = 1.89$ ;  $p > 0.05$ ) в гранулярном слое DG гиппокампа (см. рис. 3, б). Критерий Вилкоксона не показал значимого влияния фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 10$ ;  $p > 0.05$ ] на ФА в полиморфном слое DG зоны гиппокампа. Сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни выявило влияние фактора «генотип» на ФА ( $U = 2$ ;  $|Z| = 2.09$ ;  $p < 0.05$ ) в полиморфном слое DG зоны гиппокампа с правой стороны у мышей 5xFAD по сравнению с WT (0.096 [0.096; 0.098] против 0.121 [0.116; 0.130] соответственно) (см. рис. 3, в).

Данные по иммуногистохимическому окрашиванию представлены на рис. 4–6. Различия в общей плотности нейронов в гранулярном слое DG показаны на рис. 4. Статистический анализ с применением критерия Уилкоксона не выявил влияния фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 10$ ;  $p > 0.05$ ] на плотность нейронов в гранулярном слое DG. Анализ H-критерием Краскела–Уоллиса показал влияние факторов «генотип» [ $H_{(1,20)} = 7.20$ ;  $p < 0.01$ ] на данный параметр. Более того, сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни выявило, что в гранулярном слое DG у самцов 5xFAD плотность нейронов в левом полушарии значительно ниже ( $U = 2.5$ ;  $|Z| = 1.98$ ;  $p < 0.05$ ), чем у WT (10.15 [9.69; 10.17] против 10.95 [10.70; 11.21] соответственно) (см. рис. 4, е).

Статистический анализ с применением критерия Уилкоксона выявил влияние фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 2$ ;  $p < 0.01$ ] на уровень нейрогенеза в гранулярном слое DG. Однако H-критерий Краскела–Уоллиса не

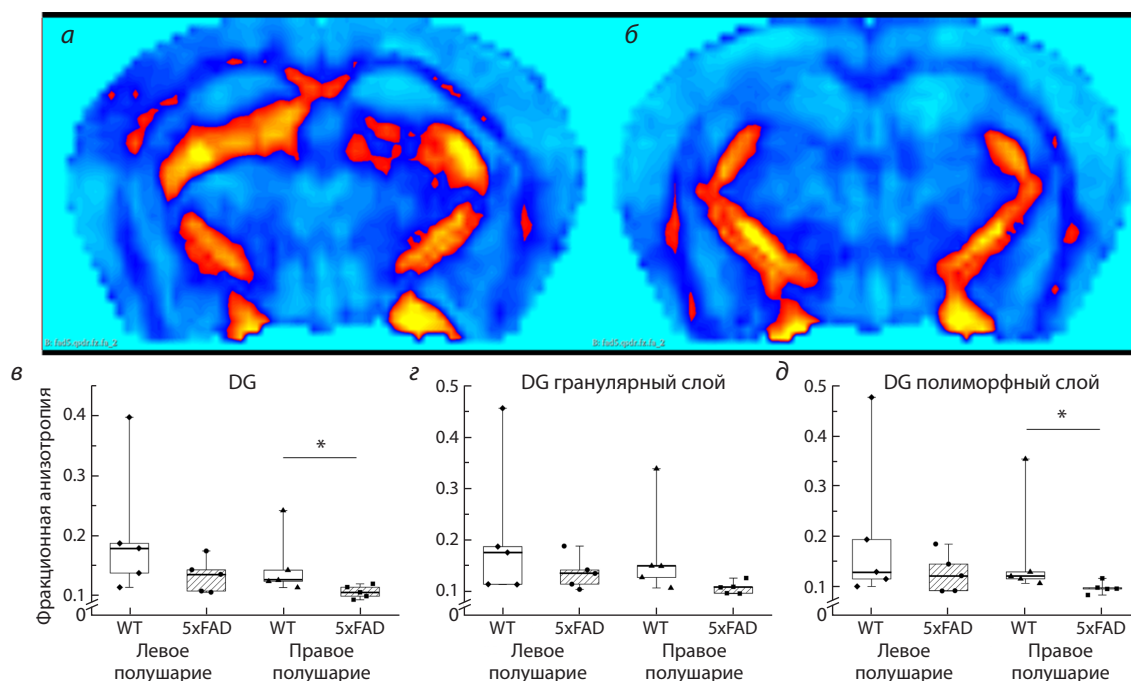


**Рис. 2.** Объем гиппокампа у мышей линий 5xFAD и WT.

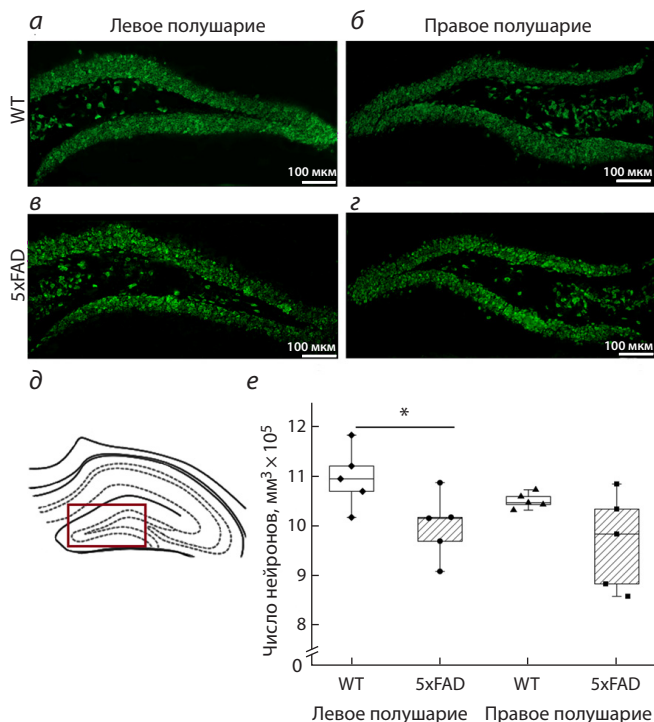
а – объемы левого и правого гиппокампов мышей 5xFAD и WT; б–д – T2-взвешенные изображения срезов гиппокампа мышей 5xFAD в правом полушарии головного мозга; е–и – T2-взвешенные изображения срезов гиппокампа мышей WT в правом полушарии головного мозга.

\*  $p < 0.05$  между WT и 5xFAD.





**Рис. 3.** Уровни фракционной анизотропии в зубчатой извилине (DG) гиппокампа у мышей линий WT (а) и 5xFAD (б).  
в – ФА в DG; г – ФА в гранулярном слое DG; д – ФА в полиморфном слое DG.  
\*  $p < 0.05$  между WT и 5xFAD.



**Рис. 4.** Плотность нейронов в гранулярном слое DG; нейроны мечены антителами против нейронального маркера (neuronal marker, NeuN).

а–г – микрофотографии срезов DG; а – левое полушарие головного мозга самцов дикого типа (WT); б – правое полушарие головного мозга самцов дикого типа (WT); в – левое полушарие головного мозга самцов 5xFAD; г – правое полушарие головного мозга самцов 5xFAD; д – схематическое обозначение исследуемой области гиппокампа; е – число нейронов в  $\text{мм}^3$ . Увеличение 400х.

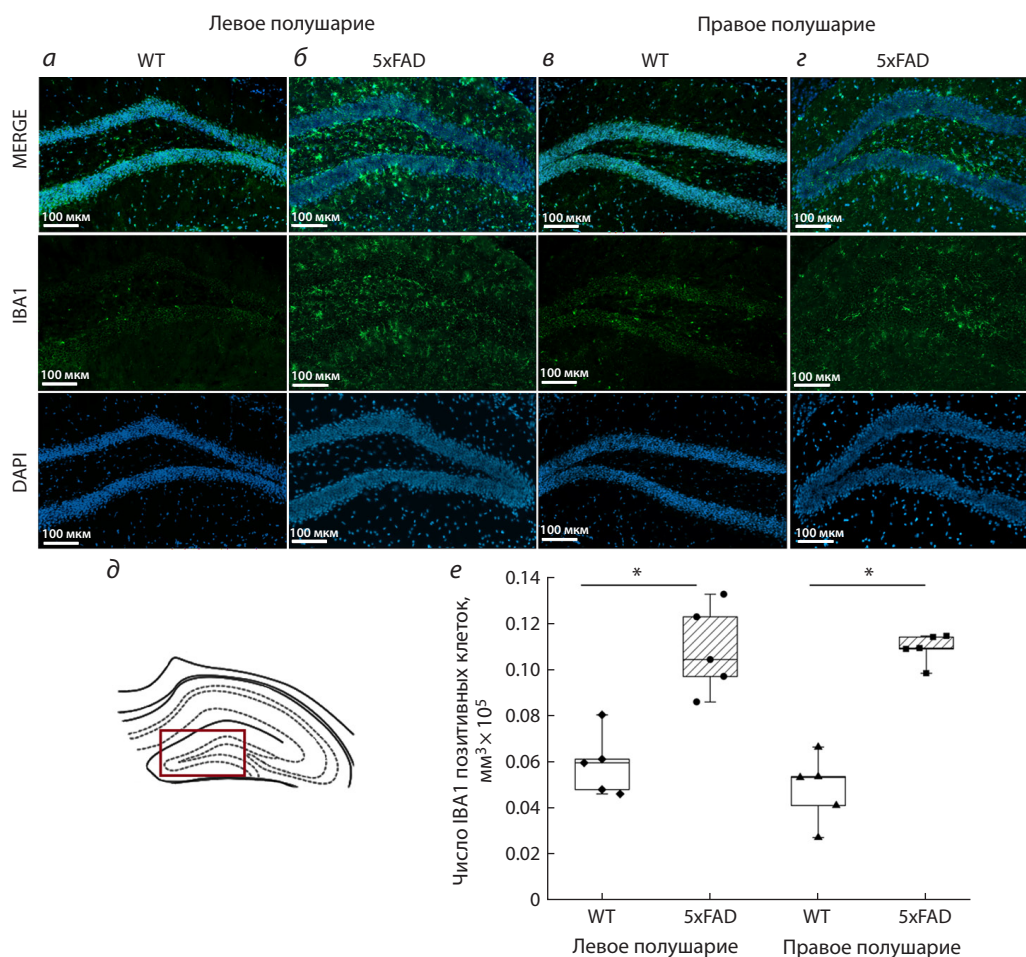
\*  $p < 0.05$  между WT и 5xFAD в левом полушарии головного мозга.

показал влияния фактора «генотип» [ $H_{(1,20)} = 1.46; p > 0.05$ ] на данный параметр. Сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни также не выявило различий ( $p > 0.05$ ) по данному параметру между самцами 5xFAD и WT в зубчатой извилине гиппокампа ни слева (0.05 [0.04;0.05] против 0.05 [0.05;0.06] соответственно), ни справа (0.05 [0.04;0.05] против 0.05 [0.04;0.05] соответственно).

Результаты изучения плотности клеток, экспрессирующих IBA1, в гранулярном и полиморфном слоях DG представлены на рис. 5. Статистический анализ при помощи критерия Уилкоксона не выявил значимого влияния фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 22; p > 0.05$ ] на плотность клеток, экспрессирующих IBA1. Тем не менее H-критерий Краскела–Уоллиса показал влияние фактора «генотип» [ $H_{(1,20)} = 13.50; p < 0.001$ ] на данный параметр. Сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни выявило, что в DG мыши 5xFAD имели большую плотность клеток, позитивных к IBA1, как в левом ( $U = 0; |Z| = 2.51; p < 0.05$ ), так и в правом полушарии ( $U = 0; |Z| = 2.51; p < 0.05$ ) по сравнению с контрольными мышами WT (0.10 [0.10;0.12] против 0.06 [0.05;0.06] для левой стороны; 0.11 [0.11;0.11] против 0.05 [0.04;0.05] для правой стороны соответственно) (см. рис. 5, е).

Различия по общей плотности включений бета-амилоида в гранулярном и полиморфном слоях DG показаны на рис. 6. Статистический анализ при помощи критерия Уилкоксона не выявил влияния фактора «асимметрия полушарий» [ $T = 19; p > 0.05$ ] на плотность включений бета-амилоида в DG. H-критерий Краскела–Уоллиса показал влияние фактора «генотип» [ $H_{(1,20)} = 14.28; p < 0.001$ ] на данный параметр. Сравнение при помощи U-критерия Манна–Уитни показало, что в зубчатой извилине гиппо-





**Рис. 5.** Плотность микроглии в DG; клетки мечены антителами против IBA1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1); ядра клеток окрашены DAPI.

а-г – микрофотографии срезов DG; а – левое полушарие головного мозга самцов дикого типа (WT); б – левое полушарие головного мозга самцов 5xFAD; в – правое полушарие головного мозга самцов дикого типа (WT); г – правое полушарие головного мозга самцов 5xFAD; д – схематическое обозначение исследуемой области гиппокампа; е – число IBA1 позитивных нейронов в мм³. Увеличение 200х.

\*  $p < 0.05$  между WT и 5xFAD в левом полушарии головного мозга.

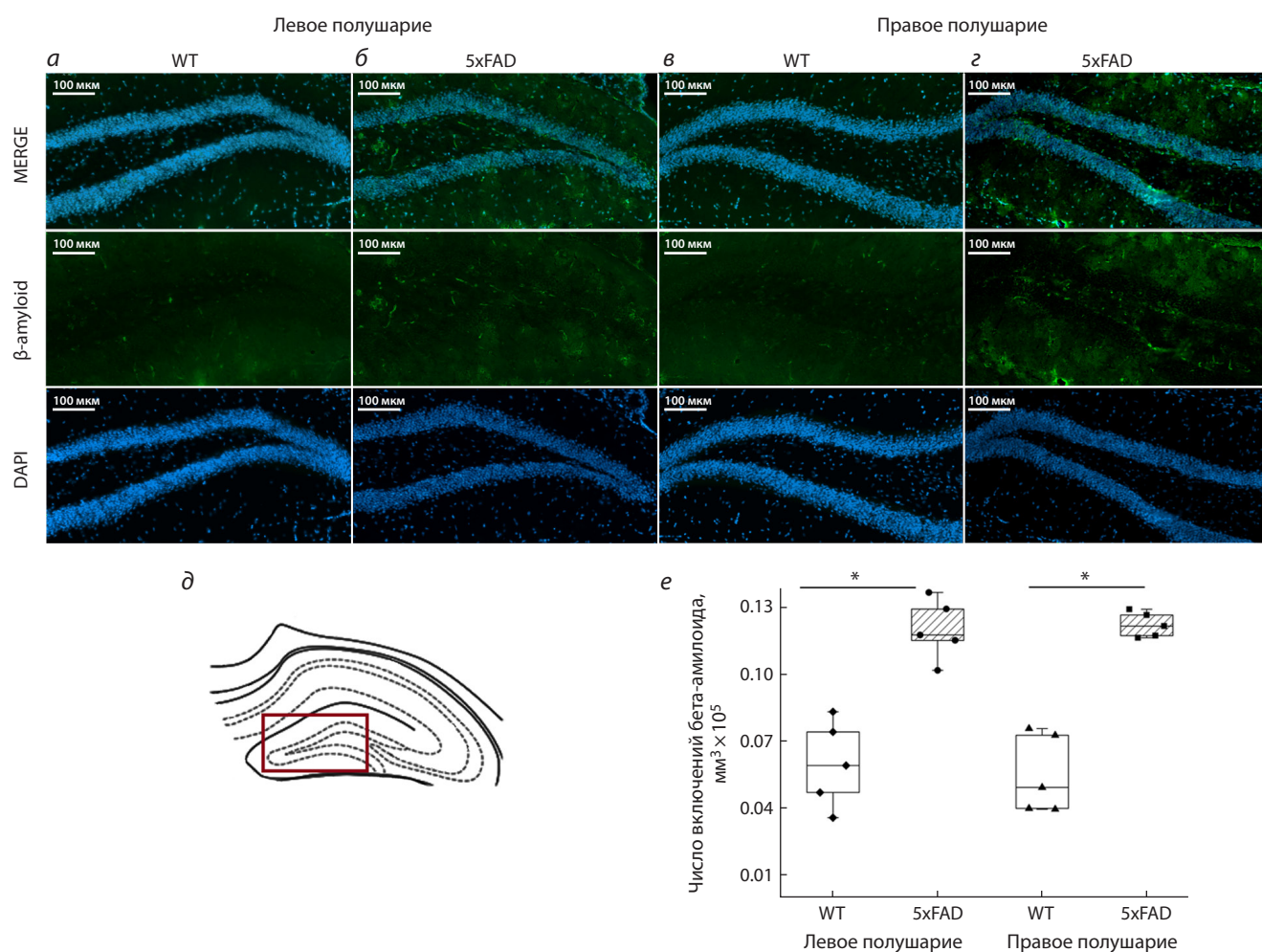
кампа мышей 5xFAD плотность бета-амилоида выше, чем в соответствующей зоне мышей дикого типа, как слева ( $U = 0$ ;  $|Z| = 2.51$ ;  $p < 0.05$ ), так и справа ( $U = 0$ ;  $|Z| = 2.51$ ;  $p < 0.05$ ) (0.12 [0.12;0.13] против 0.06 [0.05;0.07] для левой стороны; 0.12 [0.12;0.13] против 0.05 [0.04;0.07] для правой стороны соответственно) (см. рис. 6, е).

## Обсуждение

Мутантные гены *APP* и *PSEN1* вызывают накопление бета-амилоида в ЦНС, что является одним из наиболее значимых характерных признаков БА (Petit et al., 2022; Nasb et al., 2024; Perneczky et al., 2024). В нашем исследовании у гетерозиготных мышей 5xFAD с мутантными генами *APP* и *PSEN1* человека обнаружено существенное повышение включений бета-амилоида в зубчатой извилине гиппокампа как в правом, так и в левом полушарии головного мозга, что согласуется с результатами прошлых работ, в которых показано повышение уровня бета-амилоида в DG гиппокампа на данной модели БА (Giannoni et

al., 2016; Kantarci et al., 2020; Nairuz et al., 2024; Zhu, Liu, 2025).

В частности, исследование Т. Nairuz с коллегами (2024) показало, что в возрасте 6 и 12 мес. у самцов мышей 5xFAD плотность включений бета-амилоида существенно повышена в CA1, CA3 и DG отделах гиппокампа. Причем в возрасте 6 мес. среди трех исследованных отделов гиппокампа именно в DG наблюдали максимальный уровень включений бета-амилоида у мышей 5xFAD в сравнении с контрольными мышами дикого типа. В недавно опубликованной работе (Zhu, Liu, 2025) продемонстрировано, что у самок 5xFAD в еще более раннем возрасте, 4 мес., в зубчатой извилине гиппокампа наблюдали сходное возрастание включений бета-амилоида в сравнении с контрольными животными дикого типа. Накопление бета-амилоида в лобной, теменной, энторинальной коре и зубчатой извилине гиппокампа мышей 5xFAD сопровождается повреждением кровеносных сосудов в этих областях мозга (Giannoni et al., 2016).



**Рис. 6.** Плотность включений бета-амилоида в DG; бета-амилоид мечен антителами против  $\beta$ -Amyloid-(1-42); ядра клеток окрашены DAPI.

a–d – микрофотографии срезов DG; a – левое полушарие головного мозга самцов дикого типа (WT); б – левое полушарие головного мозга самцов 5xFAD; в – правое полушарие головного мозга самцов дикого типа (WT); г – правое полушарие головного мозга самцов 5xFAD; д – схематическое обозначение исследуемой области гиппокампа; e – число включений бета-амилоида в  $\text{mm}^3$ . Увеличение 200х.

\*  $p < 0.05$  между WT и 5xFAD.

Накопление бета-амилоида может вызвать у пациентов с БА нейровоспаление в различных областях головного мозга (Long, Holtzman, 2019; Perneczky et al., 2024). Клетки микроглии активируются в ответ на накопление бета-амилоида в головном мозге и группируются вокруг бляшек бета-амилоида (Meyer-Luehmann et al., 2008).

В нашем исследовании обнаружено существенное повышение плотности микроглии как в правой, так и в левой части зубчатой извилины гиппокампа самцов 5xFAD с мутантными генами *APP* и *PSEN1* человека, что согласуется с результатами других работ, в которых выявлено нейровоспаление в гиппокампе мышей 5xFAD начиная с возраста 2 мес. (Oakley et al., 2006; Kantarci et al., 2020; Nairuz et al., 2024; Westi et al., 2024). В частности, в возрасте 6 мес. уровень нейровоспаления в субикуле гиппокампа гетерозиготных мышей 5xFAD значительно возрастает по сравнению с сибсами дикого типа (Westi et al., 2024). Существенное возрастание плотности микроглии в возрасте 6–8 мес. отмечают и в DG гиппокампа мышей

5xFAD (Kantarci et al., 2020; Nairuz et al., 2024), что хорошо согласуется с полученными нами данными.

Ранее было установлено, что у пациентов с БА происходит нарушение нейрогенеза в DG гиппокампа (Moreno-Jimenez et al., 2019; Disouky, Lazarov, 2021). Однако нами не обнаружено изменения уровня нейрогенеза в зубчатой извилине у мышей 5xFAD в возрасте 6 мес. В исследованиях, проведенных в возрасте 2–4 мес., были показаны снижение уровня нейрогенеза в гиппокампе мышей 5xFAD по сравнению с контрольными животными дикого типа и его повышение при экспериментальной форме лечения (Moon et al., 2014; Ding et al., 2023; Lee et al., 2025). Однако к возрасту 7 мес. у 5xFAD отличия по данному параметру по сравнению с сибсами дикого типа пропадали (Moon et al., 2014), что, возможно, связано с резким уменьшением уровня нейрогенеза как у мышей 5xFAD, так и у контрольных мышей дикого типа.

Потеря нейронов характерна для поздних стадий БА (Braak H., Braak E., 1991). Между тем потеря нейронов

при БА не является равномерной по всему мозгу: наиболее уязвимыми оказываются энторинальная кора и некоторые отделы гиппокампа (Braak H., Braak E., 1991; Shi et al., 2009; Shih et al., 2023).

Подобные изменения также обнаружены у мышей 5xFAD, у которых с возрастом происходило снижение общего числа нейронов в различных зонах гиппокампа, в частности CA1, CA3 и DG (Jawhar et al., 2012; Kim et al., 2019; Zhang L. et al., 2021; Francis et al., 2024). В настоящем исследовании установлено, что у самцов линии 5xFAD в возрасте 6 мес. в DG гиппокампа левого полушария мозга нейронов было меньше по сравнению с контрольными животными дикого типа, в то время как в DG правого полушария таких изменений не обнаружено.

Результаты прошлых работ по оценке плотности нейронов в гиппокампе у мышей 5xFAD неоднозначны. В возрасте 4,5 мес. в DG гиппокампа мышей 5xFAD не находят существенной разницы с контролем по числу нейронов (Kim et al., 2019), но наблюдается снижение числа нейронов в этой структуре в возрасте 6–14 мес. (Kim et al., 2019; Zhang L. et al., 2021; Francis et al., 2024).

В современной нейробиологии вопросы латерализации и асимметрии мозга активно изучаются, поскольку они могут иметь решающее значение для понимания функциональных различий между полушариями и реакции на патологию (Francis et al., 2024). Обнаруженное нами асимметричное снижение числа нейронов в DG левого полушария мышей 5xFAD представляет особый интерес, поскольку проведенные ранее исследования, направленные на изучение этой области гиппокампа на данной модели БА, упускали этот фактор и оценивали число нейронов в целом по DG, без разделения на правое и левое полушарие мозга (Kim et al., 2019; Zhang L. et al., 2021; Francis et al., 2024).

Атрофия различных отделов гиппокампа и в целом гиппокампа, выявляемая с помощью методов МРТ, – важный диагностический признак болезни Альцгеймера (Shi et al., 2009; Jahanshahi et al., 2023; Hari et al., 2024). У пациентов с легкими когнитивными нарушениями объем структур левого полушария обычно изменен меньше, чем у правого (правая латерализация), хотя при выраженных формах БА наблюдают некоторое снижение правой латерализации гиппокампа (Shi et al., 2009; Jahanshahi et al., 2023).

В нашей работе выявлено, что мутантные гены *APP* и *PSEN1* человека у мышей 5xFAD могут влиять на изменение объема гиппокампа; объем правого гиппокампа мышей 5xFAD больше, чем таковой контрольных мышей дикого типа. Между тем в левом полушарии различий объема гиппокампа не найдено.

В исследованиях, проведенных на мышах 5xFAD в возрасте 2–6 мес., не обнаружено изменения объема гиппокампа в сравнении с контрольными животными дикого типа (Girard et al., 2014; Westi et al., 2024). Однако в возрасте 13 мес. объем гиппокампа у мышей 5xFAD уменьшался (Macdonald et al., 2014). Авторы этих работ оценивали объем гиппокампа целиком, не разделяя на правую и левую части и не оценивая отдельные его зоны. Наши результаты, полученные на мышах 5xFAD, свидетельствуют о том,

что измерение объема гиппокампа с учетом асимметрии может быть более надежным маркером изменений, характеризующих БА, что соответствует выводам метаанализа клинических данных (Shi et al., 2009).

Ранее с помощью ДТВ-МРТ обнаружено снижение фракционной анизотропии в некоторых областях головного мозга у людей, страдающих БА, в частности в мозолистом теле, медиальной и височной долях, своде, поясной извилине, предклинье и белом веществе префронтальной коры (Teipel et al., 2012). Снижение ФА может быть связано с увеличением объема внеклеточного пространства и нейродегенерацией (Hong et al., 2013; Nowrangi et al., 2013) и свидетельствовать о том, что молекулы воды двигаются не в одном направлении, т. е. по аксонам, как это должно быть в норме, а более равномерно по всей площади из-за повреждения нервных волокон. Считается, что снижение ФА, обнаруживаемое при помощи МРТ, является индикатором накопления бета-амилоида (Maharjan et al., 2022).

Исследование мозга мышей на таких генетических моделях, как 3xTg и 5xFAD, выявило снижение ФА в некоторых структурах головного мозга (Snow et al., 2017; Maharjan et al., 2022). Изменение уровней ФА может происходить по-разному, в зависимости от исследуемой области мозга, что может быть связано с его сложной микроструктурой и неоднородным накоплением бета-амилоида, а также обусловлено этим нейровоспалением (Praet et al., 2018; Maharjan et al., 2022).

В настоящей работе установлено снижение ФА в зубчатой извилине гиппокампа правого полушария мозга самцов линии 5xFAD по сравнению с контрольными животными дикого типа. Полученные нами данные, свидетельствующие об асимметрии изменений ФА в мозге мышей линии 5xFAD, согласуются с наблюдением, что на разных линиях мышей, моделирующих БА, была показана асимметрия развития данной патологии между полушариями по изменению уровней накопления бета-амилоида и нейровоспаления (Biechele et al., 2021; Shipton et al., 2022; Morrissey et al., 2023).

Ранее у мышей 5xFAD не было обнаружено нарушений ФА в гиппокампе (Maharjan et al., 2022). Однако в этом исследовании ФА оценивали без разделения на левое и правое полушария, причем в целом гиппокампе, без разделения его на отдельные области. Наши данные свидетельствуют о том, что оценка ФА в отдельных областях гиппокампа, в частности в DG, может быть более чувствительным индикатором характерных для БА нарушений головного мозга. При этом необходимо учитывать асимметрию правого и левого полушарий в отношении этого признака. Тем не менее нужно признать, что малый объем выборки в настоящем исследовании накладывает ограничения на интерпретацию результатов и требует подтверждения на больших выборках.

Гиппокамп – важная структура головного мозга, в которой происходят различного рода нарушения при БА (Moreno-Jimenez et al., 2019; Disouky, Lazarov, 2021; Zeng et al., 2021; Jahanshahi et al., 2023; Shih et al., 2023). Функциональная анатомия отделов гиппокампа, а также роль



каждого из отделов в хранении и обработке зрительной и вербальной информации, эпизодической памяти, навигации и распознавании объектов подробно изучены (Bartsch, Wulff, 2015; Zammit et al., 2017; Pang et al., 2019; Zeng et al., 2021). Между тем показано, что в ходе развития БА скорость и объем нарушений существенно различаются в разных отделах гиппокампа (Padurariu et al., 2012; Bartsch, Wulff, 2015). Высказано предположение о том, что нарушения в отдельных областях гиппокампа могут быть более точным маркером при БА, чем нарушения в гиппокампе без разделения на отделы (Zilioli et al., 2025).

Особую роль в нейронных процессах, лежащих в основе обучения и памяти, играет DG; в этой структуре происходят процессы, связанные с кодированием информации, она получает входные и выходные сигналы от различных областей гиппокампа (CA1–CA4) и неокортекса (Amaral et al., 2007; Jonas, Lisman, 2014; Bartsch, Wulff, 2015; Jahanshahi et al., 2023; Shih et al., 2023). Именно в зубчатой извилине образуются новые нейроны у взрослых людей, что происходит до глубокой старости, но нарушается при БА (Moreno-Jimenez et al., 2019), в связи с чем зубчатая извилина гиппокампа может представлять особый интерес при изучении БА (Shih et al., 2023).

В настоящей работе у гетерозиготных самцов мышей 5xFAD с мутантными генами *APP* и *PSEN1* человека в возрасте 6 мес. на фоне общего повышения уровней бета-амилоида и нейровоспаления, но при сохранении неизменным уровня нейрогенеза в DG гиппокампа в обоих полушариях головного мозга обнаружена асимметрия, проявляющаяся в различии объема гиппокампа правого и левого полушарий, снижении ФА в DG правого полушария, а также в уменьшении плотности нейронов в DG левого полушария.

Некоторые исследования отмечают асимметрию в прогрессировании признаков, характерных для БА, между полушариями головного мозга, в частности в коре (Derflinger et al., 2011; Roe et al., 2021), таламусе (McGeown et al., 2008) и гиппокампе (Shi et al., 2009; Jahanshahi et al., 2023). При помощи объемной MPT и последующего анализа T1-взвешенных изображений у пациентов с БА наблюдали изменение индекса асимметрии гиппокампа (соотношение объемов правого и левого гиппокампов), причем в нескольких его областях изменения справа были более выражены, чем слева (Jahanshahi et al., 2023).

Ранее было установлено, что в норме у мышей и крыс существует выраженная структурная и функциональная лево-правая асимметрия гиппокампа (El-Gaby et al., 2015; Sakaguchi, Sakurai, 2020), что также могло отразиться на изменении уровней прогрессирования БА в разных полушариях у самцов 5xFAD. М. El-Gaby с коллегами (2015) в своем обзоре указывают на то, что гиппокамп левого и правого полушарий имеет выраженную функциональную латерализацию, и анализируют механизмы, лежащие в основе этой асимметрии. Левый гиппокамп специализируется на ассоциативной долговременной памяти, а правый – на пространственной ориентации. Такая функциональная дифференциация достигается за счет структурных различий на уровне синапсов (El-Gaby et al., 2015).

В нашем исследовании у мышей 5xFAD с мутантными генами *APP* и *PSEN1* человека впервые выявленная асимметрия гиппокампа, в частности различие объема гиппокампа в правом и левом полушариях головного мозга, может быть связана с обнаруженным нами у мышей 5xFAD накоплением бета-амилоида в DG и вызванным этим повышением уровня нейровоспаления с обеих сторон, но при этом уменьшением плотности нейронов лишь в DG левого гиппокампа. Возможно, что у самцов мышей 5xFAD объем левого гиппокампа не отличается от дикого типа в связи с уменьшением числа нейронов в его DG при общем повышении плотности бета-амилоидных бляшек и микроглии, тогда как правый гиппокамп увеличился в размерах из-за сохранения плотности клеток и, возможно, из-за увеличения внеклеточного пространства ввиду нейровоспаления. Второе предположение заключается в том, что в более раннем возрасте самцов мышей 5xFAD объем гиппокампа как в правом, так и в левом полушарии мозга мог быть больше, чем у контрольных мышей WT из-за раннего накопления бета-амилоида и вызванного этим нейровоспаления, но последующее уменьшение числа нейронов в DG левого полушария нивелировало различие с контрольными животными именно слева.

Некоторые исследователи отмечают асимметрию развития патологических изменений, характерных для БА между полушариями головного мозга, в частности в коре (Derflinger et al., 2011; Roe et al., 2021), таламусе (McGeown et al., 2008) и гиппокампе (Shi et al., 2009; Jahanshahi et al., 2023). Ранее было выдвинуто предположение о том, что при прогрессировании БА скорость атрофии в различных областях правого и левого гиппокампа может различаться (Shi et al., 2009). Полученные нами результаты в настоящем исследовании подтверждают данное предположение.

## Заключение

Исходя из полученных результатов и анализа литературных данных, мы полагаем, что мутантные гены *APP* и *PSEN1* человека вызывают изменение в зубчатой извилине (DG области) гиппокампа, а оценка микроструктуры этой области мозга является перспективным индикатором развития характерных для БА нарушений и может быть использована для ранней диагностики БА в будущем (Shih et al., 2023). В частности, обнаруженные нами изменения объема гиппокампа и его асимметрия могут стать полезным биомаркером для диагностики болезни Альцгеймера.

**Соблюдение этических стандартов.** Все исследования одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 215 от 25.02.2025) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS № 123).

## Список литературы / References

- Запара Т.А., Ромащенко А.В., Проскура А.Л., Ратушняк А.С. Влияние физической активности на структурную асимметрию гиппокампа мыши. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018; 22(8):1084–1089. doi 10.18699/VJ18.454  
[Zapara T.A., Romashchenko A.V., Proskura A.L., Ratushnyak A.S. Effect of physical activity on structural asymmetry of mouse hip-

- posampus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2018;22(8):1084-1089. doi 10.18699/VJ18.454 (in Russian)]
- Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Ульданова Е.Е., Чуйко Э.А., Напримеров В.А., Липина Т.В., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. Изменения в социальном предпочтении места и плотность дофаминергических нейронов в вентральном темпентуме у *Clnt2*-КО мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(2):177-184. doi 10.18699/VJGB-23-14 [Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Uldanova K.E., Chuyko E.A., Naprimerov V.A., Lipina T.V., Amstislavskaya T.G., Amstislavsky S.Ya. Alterations in the social-conditioned place preference and density of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area in *Clnt2*-KO mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(2):177-184. doi 10.18699/VJGB-23-14]
- Aldard P.A., Tran B.A., Finkelstein D.I., Desmond P.M., Johnston L.A., Bush A.I., Egan G.F. A review of  $\beta$ -amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2014;8:327. doi 10.3389/fnins.2014.00327
- Ai M., Liu Y., Liu D., Yan C., Wang X., Chen X. Research progress in predicting the conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease via multimodal MRI and artificial intelligence. *Front Neurol*. 2025;16:1596632. doi 10.3389/fneur.2025.1596632
- Amaral D.G., Scharfman H.E., Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007;163:3-22. doi 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Bartsch T., Wulff P. The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Neuroscience*. 2015;309:1-16. doi 10.1016/j.neuroscience.2015.07.084
- Beaujoin J., Palomero-Gallagher N., Boumezeur F., Axer M., Bernard J., Poupon F., Schmitz D., Mangin J.F., Poupon C. Post-mortem inference of the human hippocampal connectivity and microstructure using ultra-high field diffusion MRI at 11.7 T. *Brain Struct Funct*. 2018;223(5):2157-2179. doi 10.1007/s00429-018-1617-1
- Bermejo-Pareja F., Del Ser T. Controversial past, splendid present, unpredictable future: a brief review of Alzheimer disease history. *J Clin Med*. 2024;13:536. doi 10.3390/jcm13020536
- Biechele G., Wind K., Blume T., Sacher C., Beyer L., Eckenweber F., Franzmeier N., ... Bartenstein P., Cumming P., Rominger A., Herms J., Brendel M. Microglial activation in the right amygdala-entorhinal-hippocampal complex is associated with preserved spatial learning in *App<sup>NL-G-F</sup>* mice. *NeuroImage*. 2021;230:117707. doi 10.1016/j.neuroimage.2020.117707
- Bloom G.S. Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014;71(4):505-508. doi 10.1001/jamaneurol.2013.5847
- Braak H., Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82:239-259. doi 10.1007/BF00308809
- Butt A.M., De La Rocha I., Rivera A. Oligodendroglial cells in Alzheimer's disease. In: Verkhratsky A., Ho M., Zorec R., Parpura V. (Eds) Neuroglia in Neurodegenerative Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1175. Springer, 2019;325-333. doi 10.1007/978-981-13-9913-8\_12
- De Strooper B., Iwatsubo T., Wolfe M.S. Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(1):a006304. doi 10.1101/cshperspect.a006304
- Derflinger S., Sorg C., Gaser C., Myers N., Arsic M., Kurz A., Zimmer C., Wohlschlagel A., Muhlau M. Grey-matter atrophy in Alzheimer's disease is asymmetric but not lateralized. *J Alzheimers Dis*. 2011;25(2):347-357. doi 10.3233/JAD-2011-110041
- Ding Y., Li L., Wang S., Cao Y., Yang M., Dai Y., Lin H., Li J., Liu Y., Wang Z., Liu W., Tao J. Electroacupuncture promotes neurogenesis in the dentate gyrus and improves pattern separation in an early Alzheimer's disease mouse model. *Biol Res*. 2023;56:65. doi 10.1186/s40659-023-00472-z
- Disouky A., Lazarov O. Adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2021;177:137-156. doi 10.1016/bs.pmbts.2020.09.002
- El-Gaby M., Shipton O.A., Paulsen O. Synaptic plasticity and memory: new insights from hippocampal left-right asymmetries. *Neuroscientist*. 2015;21(5):490-502. doi 10.1177/1073858414550658
- Francis J.S., Nguyen Q., Markov V., Leone P. Over-expression of N-acetylaspartate synthase exacerbates pathological energetic deficit and accelerates cognitive decline in the 5x*FAD* mouse. *J Neurochem*. 2024;168(2):69-82. doi 10.1111/jnc.16044
- Giannoni P., Arango-Lievano M., Neves I.D., Rousset M.C., Baranger K., Rivera S., Jeanneteau F., Claeysen S., Marchi N. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2016;88:107-117. doi 10.1016/j.nbd.2016.01.001
- Girard S., Jacquet M., Baranger K., Migliorati M., Escoffier G., Bernard A., Khrestchatsky M., Feron F., Rivera S., Roman F., Marchetti E. Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5x*FAD* transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 2014;24(7):762-772. doi 10.1002/hipo.22267
- Gu L., Wu D., Tang X., Qi X., Li X., Bai F., Chen X., Ren Q., Zhang Z. Myelin changes at the early stage of 5x*FAD* mice. *Brain Res Bull*. 2018;137:285-293. doi 10.1016/j.brainresbull.2017.12.013
- Hari I., Adeyemi O.F., Gowland P., Bowtell R., Mouglin O., Vesey P., Shah J., Mukaetova-Ladinska E.B., Hosseini A.A. Memory impairment in Amyloid $\beta$ -status Alzheimer's disease is associated with a reduction in CA1 and dentate gyrus volume: *in vivo* MRI at 7T. *NeuroImage*. 2024;292:120607. doi 10.1016/j.neuroimage.2024.120607
- Harrison J.R., Bhatia S., Tan Z.X., Mirza-Davies A., Benkert H., Tax C.M.W., Jones D.K. Imaging Alzheimer's genetic risk using diffusion MRI: a systematic review. *NeuroImage Clin*. 2020;27:102359. doi 10.1016/j.nicl.2020.102359
- Hong Y.J., Yoon B., Lim S.C., Shim Y.S., Kim J.Y., Ahn K.J., Han I.W., Yang D.W. Microstructural changes in the hippocampus and posterior cingulate in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a diffusion tensor imaging study. *Neurol Sci*. 2013;34(7):1215-1221. doi 10.1007/s10072-012-1225-4
- Jahanshahi A.R., Naghdi Sadeh R., Khezerloo D. Atrophy asymmetry in hippocampal subfields in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Exp Brain Res*. 2023;241:495-504. doi 10.1007/s00221-022-06543-z
- Jankowsky J.L., Zheng H. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1):89. doi 10.1186/s13024-017-0231-7
- Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A., Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$  aggregation in the 5x*FAD* mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33:196.e29-196.e40. doi 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027
- Johnson G.A., Tian Y., Cofer G.P., Cook J.C., Gee J.C., Hall A., Hornburg K., Qi Y., Yeh F.-C., Wang N., White L.E., Williams R.W. HiDiver: a suite of methods to merge magnetic resonance histology, light sheet microscopy, and complete brain delineations. *bioRxiv*. 2022. doi 10.1101/2022.02.10.479607
- Jonas P., Lisman J. Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits. *Front Neural Circuits*. 2014;8:107. doi 10.3389/fncir.2014.00107
- Kantarci A., Tognoni C.M., Yaghmour W., Marghalani A., Stephens D., Ahn J.Y., Carreras I., Dedeglu A. Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2020;10:18561. doi 10.1038/s41598-020-75517-4
- Kesler S.R., Acton P., Rao V., Ray W.J. Functional and structural connectome properties in the 5x*FAD* transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Netw Neurosci*. 2018;2(2):241-258. doi 10.1162/netn\_a\_00048
- Kim S., Nam Y., Jeong Y.O., Park H.H., Lee S.K., Shin S.J., Jung H., ... Yu J., Yoo D.H., Park S.H., Jeon S.G., Moon M. Topographical vi-

- sualization of the reciprocal projection between the medial septum and the hippocampus in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20:3992. doi 10.3390/ijms20163992
- Koss D.J., Jones G., Cranston A., Gardner H., Kanaan N.M., Platt B. Soluble pre-fibrillar tau and  $\beta$ -amyloid species emerge in early human Alzheimer's disease and track disease progression and cognitive decline. *Acta Neuropathol.* 2016;132:875-895. doi 10.1007/s00401-016-1632-3
- Lee H., Hossain M.K., Lee H.Y., Kumar V., Shin S.J., Kim B.H., Park H.H., Son J.G., Moon M., Kim H.R. Taurine suppresses A $\beta$  aggregation and attenuates Alzheimer's disease pathologies in 5xFAD mice and patient-derived cerebral organoids. *Biomed Pharmacother.* 2025;191:118527. doi 10.1016/j.biopha.2025.118527
- Lipengolts A.A., Finogenova Y.A., Skribitsky V.A., Shpakova K.E., Anaki A., Motiei M., Semkina A.S., Abakumov M.A., Smirnova A.V., Grigorieva E.Y., Popovtzer R. CT and MRI imaging of theranostic bimodal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NanoParticles in tumor bearing mice. *Int J Mol Sci.* 2022;24:70. doi 10.3390/ijms24010070
- Long J.M., Holtzman D.M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell.* 2019;179:312-339. doi 10.1016/j.cell.2019.09.001
- Macdonald I.R., DeBay D.R., Reid G.A., O'Leary T.P., Jollymore C.T., Mawko G., Burrell S., Martin E., Bowen C.V., Brown R.E., Darvesh S. Early detection of cerebral glucose uptake changes in the 5xFAD mouse. *Curr Alzheimer Res.* 2014;11(5):450-460. doi 10.2174/1567205011666140505111354
- Maharjan S., Tsai A.P., Lin P.B., Ingraham C., Jewett M.R., Landreth G.E., Oblak A.L., Wang N. Age-dependent microstructure alterations in 5xFAD mice by high-resolution diffusion tensor imaging. *Front Neurosci.* 2022;16:964654. doi 10.3389/fnins.2022.964654
- McGeown W.J., Shanks M.F., Venneri A. Prolonged cholinergic enrichment influences regional cortical activation in early Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(2):465-476. doi 10.2147/ndt.s2461
- Meyer-Luehmann M., Spires-Jones T.L., Prada C., Garcia-Alloza M., de Calignon A., Rozkalne A., Koenigsnecht-Talboo J., Holtzman D.M., Bacskai B.J., Hyman B.T. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2008;451(7179):720-724. doi 10.1038/nature06616
- Moon M., Cha M.Y., Mook-Jung I. Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5xFAD mice. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(1):233-241. doi 10.3233/JAD-132417
- Moreno-Jimenez E.P., Flor-Garcia M., Terreros-Roncal J., Rabano A., Cafini F., Pallas-Bazarra N., Avila J., Llorens-Martin M. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2019;25(4):554-560. doi 10.1038/s41591-019-0375-9
- Morrissey Z.D., Gao J., Zhan L., Li W., Fortel L., Saido T., Saito T., Bakker A., Mackin S., Ajilore O., Lazarov O., Leow A.D. Hippocampal functional connectivity across age in an App knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2023;14:1085989. doi 10.3389/fnagi.2022.1085989
- Nairuz T., Heo J.C., Lee J.H. Differential glial response and neurodegenerative patterns in CA1, CA3, and DG hippocampal regions of 5xFAD mice. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12156. doi 10.3390/ijms252212156
- Nasb M., Tao W., Chen N. Alzheimer's disease puzzle: delving into pathogenesis hypotheses. *Aging Dis.* 2024;15:43-73. doi 10.14336/AD.2023.0608
- Naumenko V., Garanina A., Nikitin A., Vodopyanov S., Vorobyeva N., Tsareva Y., Kunin M., Ilyasov A., Semkina A., Chekhonin V., Abakumov M., Majouga A. Biodistribution and tumors MRI contrast enhancement of magnetic nanocubes, nanoclusters, and nanorods in multiple mice models. *Contrast Media Mol Imaging.* 2018;2018:8264208. doi 10.1155/2018/8264208
- Nie B., Wu D., Liang S., Liu H., Sun X., Li P., Huang Q., Zhang T., Feng T., Ye S., Zhang Z., Shan B. A stereotaxic MRI template set of mouse brain with fine sub-anatomical delineations: application to MEMRI studies of 5xFAD mice. *Magn Reson Imaging.* 2019;57:83-94. doi 10.1016/j.mri.2018.10.014
- Nowrangi M.A., Lyketsos C.G., Leoutsakos J.M., Oishi K., Albert M., Mori S., Mielke M.M. Longitudinal, region-specific course of diffusion tensor imaging measures in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2013;9(5):519-528. doi 10.1016/j.jalz.2012.05.2186
- Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vasar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006;26(40):10129-10140. doi 10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
- Oblak A.L., Lin P.B., Kotredes K.P., Pandey R.S., Garceau D., Williams H.M., Uyar A., ... Territo P.R., Carter G.W., Howell G.R., Sasser M., Lamb B.T. Comprehensive evaluation of the 5xFAD mouse model for preclinical testing applications: a MODEL-AD study. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:713726. doi 10.3389/fnagi.2021.713726
- Padurariu M., Ciobica A., Mavroudis I., Fotiou D., Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub.* 2012;24(2):152-158
- Pang C.C., Kiecker C., O'Brien J.T., Noble W., Chang R.C. Ammon's horn 2 (CA2) of the hippocampus: a long-known region with a new potential role in neurodegeneration. *Neuroscientist.* 2019;25(2):167-180. doi 10.1177/1073858418778747
- Paxinos G., Franklin K. Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, 2012
- Pernecky R., Dom G., Chan A., Falkai P., Bassetti C. Anti-amyloid antibody treatments for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2024;31:e16049. doi 10.1111/ene.16049
- Petit D., Fernandez S.G., Zoltowska K.M., Enzlein T., Ryan N.S., O'Connor A., Szaruga M., Hill E., Vandenberghe R., Fox N.C., Chavez-Gutiérrez L. A $\beta$  profiles generated by Alzheimer's disease causing *PSEN1* variants determine the pathogenicity of the mutation and predict age at disease onset. *Mol Psychiatry.* 2022;27(6):2821-2832. doi 10.1038/s41380-022-01518-6
- Pink A.E., Simpson M.A., Desai N., Dafou D., Hills A., Mortimer P., Smith C.H., Trembath R.C., Barker J.N.W. Mutations in the  $\gamma$ -secretase genes *NCSTN*, *PSENEN*, and *PSEN1* underlie rare forms of hidradenitis suppurativa (acne inversa). *J Invest Dermatol.* 2012;132(10):2459-2461. doi 10.1038/jid.2012.162
- Praet J., Manyakov N.V., Muchene L., Mai Z., Terzopoulos V., de Backer S., Torremans A., ... Bijmens L., Pemberton D.J., Schmidt M.E., Van der Linden A., Verhoye M. Diffusion kurtosis imaging allows the early detection and longitudinal follow-up of amyloid- $\beta$ -induced pathology. *Alzheimers Res Ther.* 2018;10(1):1. doi 10.1186/s13195-017-0329-8
- Research Models 5xFAD (C57BL6) [Database]. URL: <https://www.alzforum.org/research-models/5xfad-c57bl6>
- Richard B.C., Kurdakova A., Baches S., Bayer T.A., Weggen S., Wirths O. Gene dosage dependent aggravation of the neurological phenotype in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;45(4):1223-1236. doi 10.3233/JAD-143120
- Roe J.M., Vidal-Piñeiro D., Sørensen Ø., Brandmaier A.M., Düzel S., Gonzalez H.A., Kievit R.A., ... Rundel M.M., Walhovd K.B., Fjell A.M., Westerhausen R.; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Flagship Study of Ageing. Asymmetric thinning of the cerebral cortex across the adult lifespan is accelerated in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2021;12(1):721. doi 10.1038/s41467-021-21057-y (Erratum in: *Nat Commun.* 2022;13(1):834. doi 10.1038/s41467-022-28514-2)
- Rose S.E., Chen F., Chalk J.B., Zelaya F.O., Strugnell W.E., Benson M., Semple J., Doddrell D.M. Loss of connectivity in Alzheimer's disease: an evaluation of white matter tract integrity with colour coded MR diffusion tensor imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69(4):528-530. doi 10.1136/jnnp.69.4.528



- Sakaguchi Y., Sakurai Y. Left-right functional difference of the rat dorsal hippocampus for short-term memory and long-term memory. *Behav Brain Res.* 2020;382:112478. doi 10.1016/j.bbr.2020.112478
- Sasaguri H., Nilsson P., Hashimoto S., Nagata K., Saito T., De Strooper B., Hardy J., Vassar R., Winblad B., Saido T.C. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J.* 2017; 36(17):2473-2487. doi 10.15252/embj.201797397
- Shi F., Liu B., Zhou Y., Yu C., Jiang T. Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: meta-analyses of MRI studies. *Hippocampus.* 2009;19:1055-1064. doi 10.1002/hipo.20573
- Shih N.C., Kurniawan N.D., Cabeen R.P., Korobkova L., Wong E., Chui H.C., Clark K.A., Miller C.A., Hawes D., Jones K.T., Sepehrband F. Microstructural mapping of dentate gyrus pathology in Alzheimer's disease: a 16.4 Tesla MRI study. *NeuroImage Clin.* 2023;37:103318. doi 10.1016/j.nicl.2023.103318
- Shipton O.A., Tang C.S., Paulsen O., Vargas-Caballero M. Differential vulnerability of hippocampal CA3-CA1 synapses to A $\beta$ . *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10:45. doi 10.1186/s40478-022-01350-7
- Snow W.M., Dale R., O'Brien-Moran Z., Buist R., Peirson D., Martin M., Albeni B.C. *In vivo* detection of gray matter neuropathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease with diffusion tensor imaging. *J Alzheimers Dis.* 2017;58(3):841-853. doi 10.3233/JAD-170136
- Tang X., Wu D., Gu L.H., Nie B.B., Qi X.Y., Wang Y.J., Wu F.F., Li X.L., Bai F., Chen X.C., Xu L., Ren Q.G., Zhang Z.J. Spatial learning and memory impairments are associated with increased neuronal activity in 5xFAD mouse as measured by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Oncotarget.* 2016;7(36):57556-57570. doi 10.18632/oncotarget.11353
- Teipel S.J., Wegrzyn M., Meindl T., Frisoni G., Bokde A.L., Fellgiebel A., Filippi M., Hampel H., Kloppel S., Hauenstein K., Ewers M.; EDSD study group. Anatomical MRI and DTI in the diagnosis of Alzheimer's disease: a European multicenter study. *J Alzheimers Dis.* 2012;31:33-47. doi 10.3233/JAD-2012-112118
- Veale T., Malone I.B., Poole T., Parker T.D., Slattery C.F., Paterson R.W., Foulkes A.J.M., Thomas D.L., Schott J.M., Zhang H., Fox N.C., Cash D.M. Loss and dispersion of superficial white matter in Alzheimer's disease: a diffusion MRI study. *Brain Commun.* 2021;3:fcab272. doi 10.1093/braincomms/fcab272
- Wang C., Wei Y., Li J., Li X., Liu Y., Hu Q., Wang Y.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Asymmetry-enhanced attention network for Alzheimer's diagnosis with structural Magnetic Resonance Imaging. *Comput Biol Med.* 2022;151:106282. doi 10.1016/j.compbiomed.2022.106282
- Wang L., Benzinger T.L., Su Y., Christensen J., Friedrichsen K., Aldea P., McConathy J., Cairns N.J., Fagan A.M., Morris J.C., Ances B.M. Evaluation of Tau imaging in staging Alzheimer disease and revealing interactions between  $\beta$ -amyloid and tauopathy. *JAMA Neurol.* 2016;73(9):1070-1077. doi 10.1001/jamaneurol.2016.2078
- Wang N., Zhuang J., Wei H., Dibb R., Qi Y., Liu C. Probing demyelination and remyelination of the cuprizone mouse model using multimodality MRI. *J Magn Reson Imaging.* 2019;50(6):1852-1865. doi 10.1002/jmri.26758
- Westi E.W., Molhemi S., Hansen C.T., Skoven C.S., Knopner R.W., Ahmad D.A., Rindshøj M.B., Ameen A.O., Hansen B., Kohlmeier K.A., Aldana B.I. Comprehensive analysis of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease using dMRI, immunohistochemistry, and neuronal and glial functional metabolic mapping. *Biomolecules.* 2024;14:1294. doi 10.3390/biom14101294
- Yeh F.C., Tseng W.Y. NTU-90: a high angular resolution brain atlas constructed by q-space diffeomorphic reconstruction. *NeuroImage.* 2011;58:91-99. doi 10.1016/j.neuroimage.2011.06.021
- Yeh F.C., Wedeen V.J., Tseng W.Y. Generalized *q*-sampling imaging. *IEEE Trans Med Imaging.* 2010;29(9):1626-1635. doi 10.1109/TMI.2010.2045126
- Zammit A.R., Ezzati A., Zimmerman M.E., Lipton R.B., Lipton M.L., Katz M.J. Roles of hippocampal subfields in verbal and visual episodic memory. *Behav Brain Res.* 2017;317:157-162. doi 10.1016/j.bbr.2016.09.038
- Zeng Q., Li K., Luo X., Wang S., Xu X., Li Z., Zhang T., ... Liu Z., Chen Y., Huang P., Zhang M.; The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Distinct atrophy pattern of hippocampal subfields in patients with progressive and stable mild cognitive impairment: a longitudinal MRI study. *J Alzheimers Dis.* 2021;79(1):237-247. doi 10.3233/JAD-200775
- Zhang C., Morozova A.Y., Abakumov M.A., Mel'nikov P.A., Gabashvili A.N., Chekhonin V.P. Evaluation of the optimal number of implanted mesenchymal stem cells for the treatment of post-traumatic syrinx and recovery of motor activity after chronic spinal cord injury. *Bull Exp Biol Med.* 2023;175(4):557-568. doi 10.1007/s10517-023-05904-0
- Zhang L., Li J., Lin A. Assessment of neurodegeneration and neuronal loss in aged 5xFAD mice. *STAR Protoc.* 2021;2(4):100915. doi 10.1016/j.xpro.2021.100915
- Zhu C., Liu X. Behavioral and pathological characteristics of 5xFAD female mice in the early stage. *Sci Rep.* 2025;15(1):6924. doi 10.1038/s41598-025-90335-2
- Zilioli A., Pancaldi B., Baumeister H., Busi G., Misirocchi F., Mutti C., Florindo I., Morelli N., Mohanty R., Berron D., Westman E., Spallazzi M. Unveiling the hippocampal subfield changes across the Alzheimer's disease continuum: a systematic review of neuroimaging studies. *Brain Imaging Behav.* 2025;19(1):253-267. doi 10.1007/s11682-024-00952-0

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.10.2025. После доработки 13.05.2026. Принята к публикации 14.05.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-93

## Оценка таксономического и генетического разнообразия лесных мышей рода *Apodemus* степной зоны Центрального Предкавказья

Ф.А. Темботова , А.Х. Амшокова , М.С. Гудова  , Е.П. Кононенко 

Институт экологии горных территорий им. А.К. Темботова Российской академии наук, Нальчик, Россия

 mpapieva@inbox.ru

**Аннотация.** Степные экосистемы – одни из наиболее измененных местообитаний из-за антропогенного давления и быстрых изменений в землепользовании. За несколько десятилетий XX в. биогеоценозы степных равнин и значительной части лесостепи Центрального Предкавказья почти полностью утратили свой первоначальный облик. Результатом антропогенного воздействия являются сокращение пригодных местообитаний, их фрагментация и т.д. При этом известно, что длительная изоляция популяции, вызванная естественной или антропогенной фрагментацией среды обитания, может привести к изменению генетической структуры популяции, в частности к уменьшению генетического разнообразия и сокращению общей эффективной численности популяции, что особенно губительно для популяции небольшого размера. Актуальность проведения настоящего исследования связана с отсутствием современных данных, касающихся видового состава, генетической структуры, генетического разнообразия, биотопического распространения и численности представителей лесных мышей рода *Apodemus* в условиях степной зоны Центрального Предкавказья. На основании анализа изменчивости фрагмента гена цитохрома *b* (*cyt b*) митохондриальной ДНК впервые изучены видовой состав и генетическое разнообразие видов-двойников лесных мышей рода *Apodemus* в условиях степной зоны Центрального Предкавказья. По результатам молекулярно-генетического анализа род *Apodemus* представлен тремя видами: *A. uralensis*, *A. witherbyi* и *A. flavicollis*. На рассматриваемой территории *A. flavicollis* и *A. witherbyi* описаны впервые. Из трех таксонов наиболее высоким уровнем генетического разнообразия характеризуется *A. uralensis*. Результаты молекулярного датирования позволяют предположить, что из трех видов первым заселил территорию Центрального Предкавказья *A. uralensis* в два этапа: примерно 370–350 тыс. лет назад и около 256 тыс. лет назад. Позднее на данную территорию в два этапа проник *A. witherbyi*: примерно 166–154 тыс. лет назад и 125–115 тыс. лет назад. *A. flavicollis* является самым молодым вселенцем на Центральном Предкавказье. Его эволюционный возраст составляет примерно 100 тыс. лет. В работе приведены особенности распространения и ландшафтно-биотопического распределения представителей рода *Apodemus* на исследованных территориях Центрального Предкавказья.

**Ключевые слова:** Центральное Предкавказье; степная зона; цитохром *b*; род *Apodemus*; генетическое разнообразие

**Для цитирования:** Темботова Ф.А., Амшокова А.Х., Гудова М.С., Кононенко Е.П. Оценка таксономического и генетического разнообразия лесных мышей рода *Apodemus* степной зоны Центрального Предкавказья. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):921-937. doi 10.18699/vjgb-26-93

**Финансирование.** Работа выполнена по программе государственного задания Института экологии горных территорий им. А.К. Темботова РАН (FMEU-2026-0001 «Разнообразие (генетическое, морфологическое, таксономическое) позвоночных животных как основа долгосрочного мониторинга природных и антропогенных экосистем»).

## Assessment of taxonomic and genetic diversity of wood mice of the genus *Apodemus* in the steppe zone of the Central Ciscaucasia

F.A. Tembotova , A.Kh. Amshokova , M.S. Gudova  , E.P. Kononenko 

Tembotov Institute of Ecology of Mountain Territories of the Russian Academy of Sciences, Nalchik, Russia

 mpapieva@inbox.ru

**Abstract.** Steppe ecosystems are among the most heavily modified habitats due to anthropogenic pressure and rapid land-use changes. Over the course of several decades of the 20th century, the biogeocenoses of the steppe plains and a significant portion of the forest-steppe of the Central Ciscaucasia have almost completely lost their original appearance.

Anthropogenic impact resulted in the reduction of suitable habitats, their fragmentation, and so on. It is known that prolonged isolation of a population, caused by natural or anthropogenic habitat fragmentation, can lead to changes in the genetic structure of the population, specifically to a decrease in genetic diversity and a reduction in the total effective population size, which is particularly detrimental to small populations. The relevance of this study is due to the lack of current data on the species composition, genetic structure, genetic diversity, habitat distribution, and abundance of *Apodemus* wood mice in the steppe zone of the Central Ciscaucasia. Based on an analysis of the mitochondrial DNA *cytochrome b* (*cyt b*) gene fragment variability, the species composition and genetic diversity of sibling species of wood mice of the genus *Apodemus* have been studied for the first time in the steppe zone of the Central Ciscaucasia. Molecular genetic analysis revealed that the genus *Apodemus* is represented by three species: *A. uralensis*, *A. witherbyi*, and *A. flavicollis*. *A. flavicollis* and *A. witherbyi* are described for the first time in this area. Of the three taxa, *A. uralensis* exhibits the highest level of genetic diversity. Molecular dating results suggest that of the three species, *A. uralensis* was the first to colonize the Central Ciscaucasia in two stages: approximately 370–350 thousand years ago and approximately 256 thousand years ago. Subsequently, *A. witherbyi* entered the area in two stages: approximately 166–154 thousand years ago and 125–115 thousand years ago. *A. flavicollis* is the youngest inhabitant of the Central Ciscaucasia, with an evolutionary age of approximately 100 thousand years. This study identifies the distribution patterns and landscape-biotope distribution of representatives of the genus *Apodemus* in the study areas of the Central Ciscaucasia.

**Key words:** Central Ciscaucasia; steppe zone; *cytochrome b*; genus *Apodemus*; genetic diversity

**For citation:** Tembotova F.A., Amshokova A.Kh., Gudova M.S., Kononenko E.P. Assessment of taxonomic and genetic diversity of wood mice of the genus *Apodemus* in the steppe zone of the Central Ciscaucasia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):921–937. doi 10.18699/vjgb-26-93

## Введение

Изучение генетической дифференциации и филогеографии широко распространенных видов имеет важное значение при исследовании современного биоразнообразия, формирования ареалов видов, последствий глобальных изменений климата и антропогенного воздействия, а также проблем биологической экспансии и инвазии (Yalkovskaya et al., 2022). Генетическое разнообразие рассматривается в качестве одного из важных среди множества факторов, определяющих адаптацию вида к изменяющимся условиям среды (Soulé, Simberloff, 1986). Чем выше генетическое разнообразие видов, обитающих как в ненарушенных, так и в сильно нарушенных средах, тем успешнее проходит адаптация, тем более популяции способны эволюционировать в ответ на давление внешних факторов среды и с меньшей вероятностью исчезнут в случае изменения условий окружающей среды (цит. по: Полякова, 2022).

В настоящее время из-за антропогенного давления и быстрых изменений в землепользовании степные экосистемы являются одними из наиболее измененных местообитаний. Как справедливо отмечает С.И. Сигида (2010), за несколько десятилетий XX в. в результате воздействия человека биогеоценозы степных равнин и значительной части лесостепи Центрального Предкавказья почти полностью утратили свой первоначальный облик. Посадка ползающих лесополос, искусственных лесов, орошение и обводнение способствовали продвижению в степные районы животных лесных и водно-приводных групп, появлению мигрантов из соседних регионов (цит. по: Пушкин, 2015). Очевидно, что подобные изменения отражаются на видовом разнообразии обитателей степных экосистем.

Следует также отметить, что в результате антропогенного воздействия происходит сокращение пригодных местообитаний, их фрагментация и т. д. А как известно, длительная изоляция популяции, вызванная естественной или антропогенной фрагментацией среды обитания, может привести к изменению генетической структуры популя-

ции, в частности к уменьшению генетического разнообразия и сокращению ее общей эффективной численности (Radespiel, Bruford, 2014; Wang et al., 2017).

Актуальность проведения настоящего исследования связана с отсутствием современных данных по видовому составу рода *Apodemus* степной зоны Центрального Предкавказья, полученных на основании молекулярно-генетического анализа. Имеющиеся работы были выполнены до появления этих методов во второй половине XX в. (Темботов, 1972). При этом следует отметить, что криптические виды, к которым относятся лесные мыши, практически неразличимы по морфологическим признакам. Неверное определение биологически важных видов формирует ложные представления о биологическом разнообразии (Сухих, 2013).

Также важно отметить, что по отдельным видам рода *Apodemus* в базе данных присутствуют лишь единичные последовательности гена цитохрома *b* (*cyt b*) мтДНК. Так, в международную генетическую базу данных Генбанк депонировано всего 18 последовательностей гена *cyt b* мтДНК, относящихся к кавказской лесной мыши, причем выборка частично включает образцы из Ирана, что ограничивает возможности для полноценного филогенетического анализа. Что касается *Apodemus witherbyi* Thomas, 1902, приведенные 26 последовательностей гена *cyt b* происходят только из Украины и Ирана. Как видно, среди данных базы Генбанк отсутствуют последовательности изучаемой территории.

В связи с изложенным было интересно изучить видовой состав, генетическую структуру и генетическое разнообразие представителей рода *Apodemus* в условиях степной зоны Центрального Предкавказья. Род *Apodemus* выбран не случайно: во-первых, лесные мыши составляют значительную долю в отловах, во-вторых, виды характеризуются различными экологическими предпочтениями и могут встречаться как в естественных (ненарушенные целинные степные участки, интразональные лесные массивы), так и в антропогенно трансформированных ландшафтах



(скирды в полях пропашных культур, берега каналов, лесополосы и т. д.).

## Материалы и методы

В работе использовались образцы тканей 153 экз. лесных мышей рода *Apodemus*, собранные в различных географических точках степной зоны Центрального Предкавказья.

Исследования проводили в Майском, Прохладненском и Терском районах Кабардино-Балкарской Республики (рис. 1). В Майском районе исследованиями были охвачены биотопы окрестностей трех населенных пунктов: с. Новоивановка, хут. Баксанский и хут. Новокурский, которые ввиду их близости мы сочли возможным объединить. Далее эта территория обозначена как хут. Баксанский (N 43.6640°, E 043.9362°, высота 224 м над ур. моря).

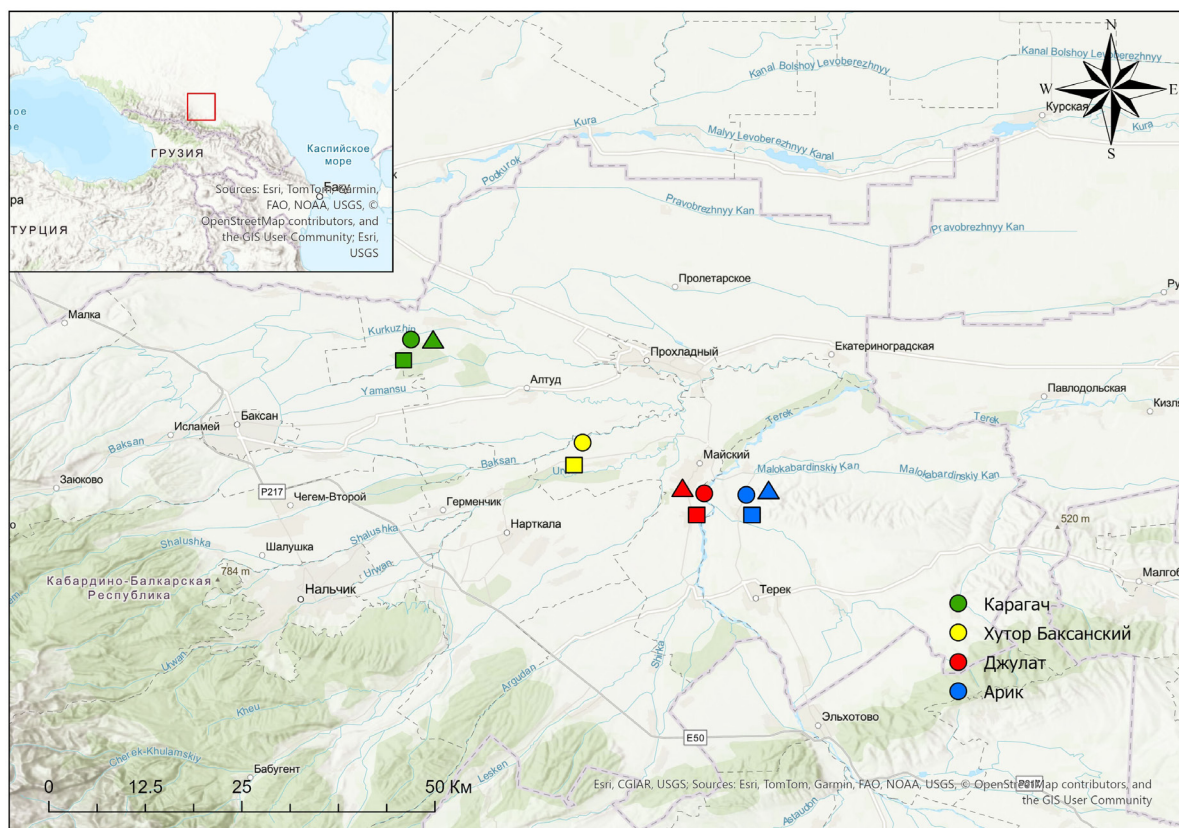
Сбор материала проводился в трех биотопах: полезащитные лесные полосы; стога на полях озимых культур; межа, непосредственно прилегающая к оросительным каналам, расположенная между полями сельскохозяйственных культур.

В Прохладненском районе, в окрестностях с. Карагач (N 43.7838°, E 43.7369°, высота 290 м над ур. моря) исследованиями были охвачены два биотопа: лес равнинный; луг между дорогой и агроценозом. В Терском районе сбор материала проводился в двух географических пунктах: в окрестностях пос. Джулат (N 43.6050°, E 44.0077°, высота

215 м над ур. моря) — два биотопа: целинные степные участки, неудобные для сельскохозяйственной обработки; равнинный лес; а в окрестностях с. Арик (Арикский хребет, N 43.6036°, E 44.1268°, высота 233 м над ур. моря) — три биотопа: степной участок (ненарушенное разнотравно-типчаковое сообщество на склоне хребта); полезащитная полоса; берег Малокабардинского оросительного канала.

Образцы тканей были зафиксированы в 96 % этиловом спирте и использованы для выделения ДНК вручную с набором реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген», Москва), согласно инструкции производителя. Амплификацию гена *cyt b* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров из работы (Yasuda et al., 2005) и при рекомендованных в цитируемой работе параметрах цикла ПЦР. Полученные ПЦР продукты очищали переосаждением в 0.15 М растворе ацетата натрия в 90 % этаноле с последующей промывкой 70 % этанолом. Результат визуализировали электрофорезом в 1.5 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Секвенирование осуществляли на базе ООО «Синтол» (Москва).

Выравнивание полученных последовательностей проводили при помощи модуля ClustalW в программном пакете BioEdit (Hall, 1999). Взвешенные (net distance) межгрупповые генетические дистанции с использованием двухпараметрической модели Кимуры (K2P) (Kimura, 1980) рассчитывали в программе Mega 6 (Tamura et al., 2013).



**Рис. 1.** Карта происхождения материала представителей рода *Apodemus* степной зоны Центрального Предкавказья: кружки — малая лесная мышь (*Apodemus uralensis* Pallas, 1811); квадраты — желтогорлая мышь (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834); треугольники — степная мышь (*Apodemus witherbyi* Thomas, 1902).

Байесовский алгоритм проведен в программе MrBayes v3.2.6 с использованием алгоритма марковских цепей по принципу Монте-Карло (MCMC) (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Для поиска оптимальных моделей применяли байесовский информационный критерий (BIC). Модели нуклеотидных замен были подобраны в программе Mega 6. В ходе анализа генерировали  $5 \times 10^6$  деревьев марковских цепей, отбор дерева выполнялся через каждые 1000 генераций. Первые 25 % отбрасывались в качестве «выгорания». Визуализацию филогенетических деревьев проводили в программе FigTree.

Чтобы оценить время дивергенции, был выполнен дополнительный анализ в BEAST версии 1.10.4 (Suchard et al., 2018). Для каждого вида приводятся модели нуклеотидных замен, рассчитанные в программе Mega 6: *A. uralensis* и *A. flavicollis* – HKY+G+I, *A. witherbyi* – HKY+G. Анализ осуществлялся с применением некоррелированной лог-нормальной модели расслабленных молекулярных часов и постоянного размера в качестве коалесцентной модели. Длина цепей MCMC составляла 60 миллионов поколений с шагом выборки в тысячу и отбрасыванием первых 10 % генераций (burn-in), при этом эффективный размер выборки (ESS) для всех параметров был больше 200. Сходимость параметров подтверждалась значениями ESS >200, оцененными в программе Tracer 1.7 (Rambaut et al., 2018).

Калибровочные точки были взяты из работы Y. Amir Afzali и R. López-Antoñanzas (2024), выполненной на грызунах Ирана, в том числе представителях семейства Мышиные. Согласно данным упомянутых авторов, виды *Mus* Linnaeus, 1758 и *Apodemus* Kaup, 1829 отделились от *Rattus* Fischer, 1803 около 12.28 млн лет назад. Оценка времени 12.28 млн лет назад для корневого узла дивергенции между *Rattus* и *Mus*+*Apodemus* была выбрана в качестве первой калибровочной точки. Также мы использовали вторую калибровочную точку – 2.09 млн лет назад, время отделения *Mus macedonicus* Petrov & Ruzic, 1983 от *M. musculus musculus* и *M. musculus domesticus*. Для видов *A. uralensis* и *A. flavicollis* использовались дополнительные калибровочные точки: для *A. uralensis* – примерно 1.5 млн лет назад, время расхождения европейской и азиатской рас (Челомина, Атопкин, 2010), для *A. flavicollis* и *A. f. ponticus* – 2.6 млн лет назад, время их разделения (Darvish et al., 2015).

В нашем исследовании результаты были получены на основании скорости мутации 2.4–3.1 % (Suzuki et al., 2015).

Построение медианной сети гаплотипов выполнено в программе Network 4.6.1 с применением алгоритма объединения медиан (Median Joining) (Bandelt et al., 1999).

Показатели молекулярного разнообразия – количество гаплотипов, значения гаплотипического ( $h$ ), нуклеотидного разнообразия ( $\pi$ ), а также тесты на нейтральность Таджимы (Tajima, 1989) и Фу (Fu, 1996) – рассчитывали в программе Arlequin v.3.5 (Excoffier, Lischer, 2010).

При оценке генетического разнообразия анализируемая длина последовательностей составила 960 п. н. у всех трех исследованных таксонов.

Информация об оригинальном материале приведена в Приложении S1, о заимствованном из базы Генбанк – в Приложении S2<sup>1</sup>.

## Результаты

В данной работе представлены результаты анализа изменчивости фрагмента гена *cyt b* мтДНК представителей рода *Apodemus* географических выборок степной зоны Центрального Предкавказья (с. Арик, пос. Джулат, с. Карагач, хут. Баксанский), которые ранее не изучались. В результате проведенного молекулярно-генетического анализа получено 153 нуклеотидные последовательности фрагмента гена *cyt b* мтДНК, из которых 73 относились к *A. uralensis*, 37 – *A. flavicollis*, 43 – *A. witherbyi* = *A. fulvipectus*. В пределах выравнивания обнаружено 225 полиморфных сайтов.

## Генетическая характеристика *A. uralensis*

Для 73 образцов *A. uralensis* получены нуклеотидные последовательности фрагмента гена цитохрома *b* мтДНК длиной 960 п. н. На основании изучения 73 последовательностей фрагмента гена цитохрома *b* мтДНК *A. uralensis* четырех популяций выявлено 75 полиморфных сайтов, из которых 40 были парсимониально-информативными.

Для построения филогенетического дерева, помимо полученных нами последовательностей *A. uralensis*, в выравнивание были включены 98 последовательностей из базы Генбанк (948 п. н.). На рис. 2 представлено байесовское дерево, построенное для 116 гаплотипов *A. uralensis*. В пределах группы *A. uralensis* можно обозначить два статистически поддержанных кластера – *A. uralensis* 1 и *A. uralensis* 2 с дистанцией 6.2 % (см. рис. 2). Первый кластер соответствует так называемой европейской расе, второй – азиатской, что согласуется с публикациями, основанными на применении как кариотипических и биохимических, так и молекулярно-генетических данных (Челомина и др., 2007; Челомина, Атопкин, 2010). Примечательно, что из включенных в анализ 27 последовательностей *A. uralensis* европейской расы из базы Генбанк ни один гаплотип не оказался идентичным митотипам *A. uralensis* степного Предкавказья. Гаплотипы *A. uralensis* из Центрального Предкавказья на филогенетическом дереве занимают несколько обособленное положение, но с низким значением апостериорной вероятности.

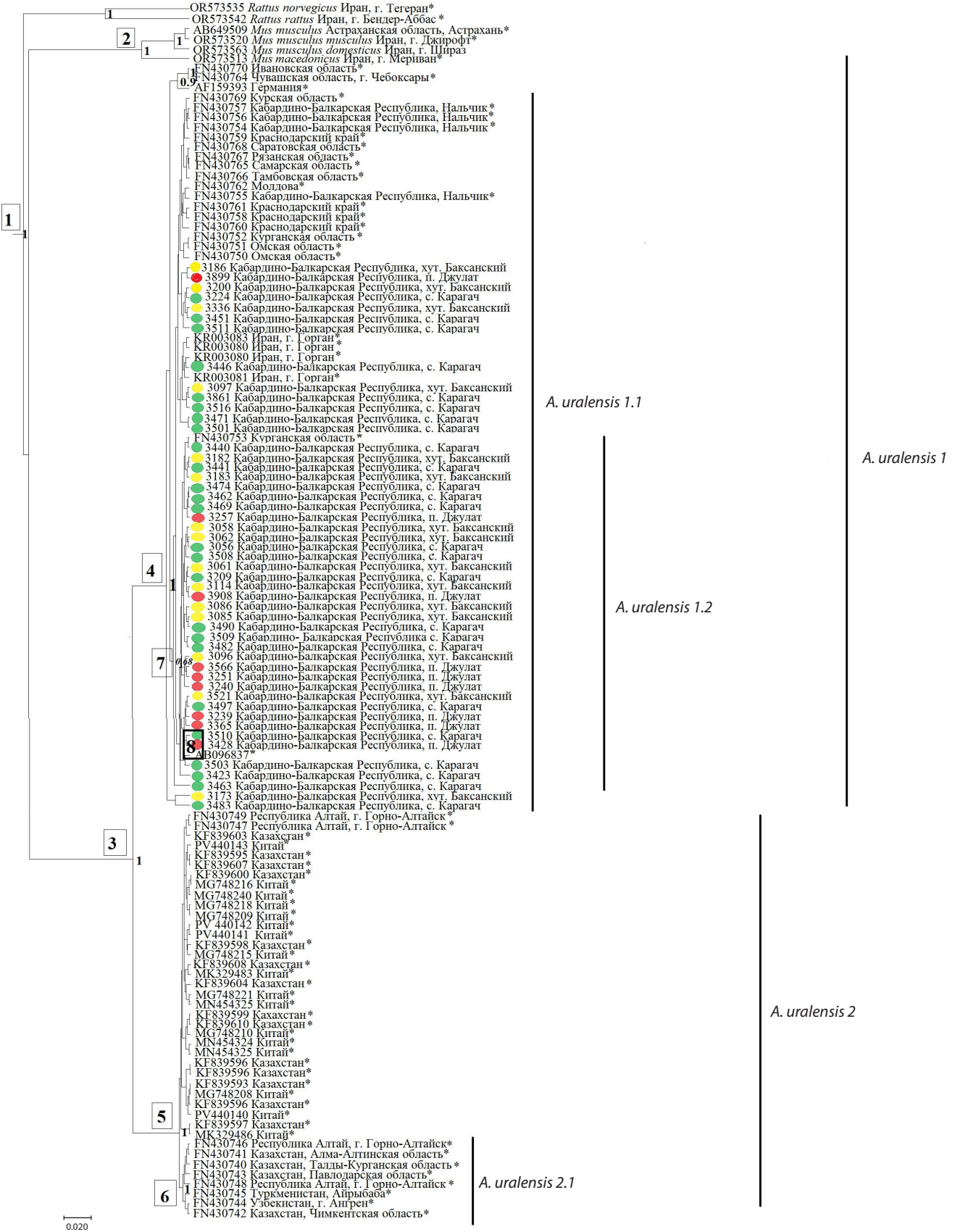
Гаплотипы мышей из Ирана и Русской равнины тоже не формируют обособленных кластеров с высоким значением апостериорной вероятности, а присутствие митотипов из Ирана и Курганской области среди гаплотипов мышей Центрального Предкавказья, вероятно, свидетельствует о существующем потоке генов. На это указывают и низкие генетические дистанции между мышами Центрального Предкавказья и Ирана (0.12 %), а также Русской равнины (0.26 %).

С целью проведения более точной кластеризации была построена медианная сеть на основе 99 последовательно-

<sup>1</sup> Приложения S1 и S2 см. по адресу:

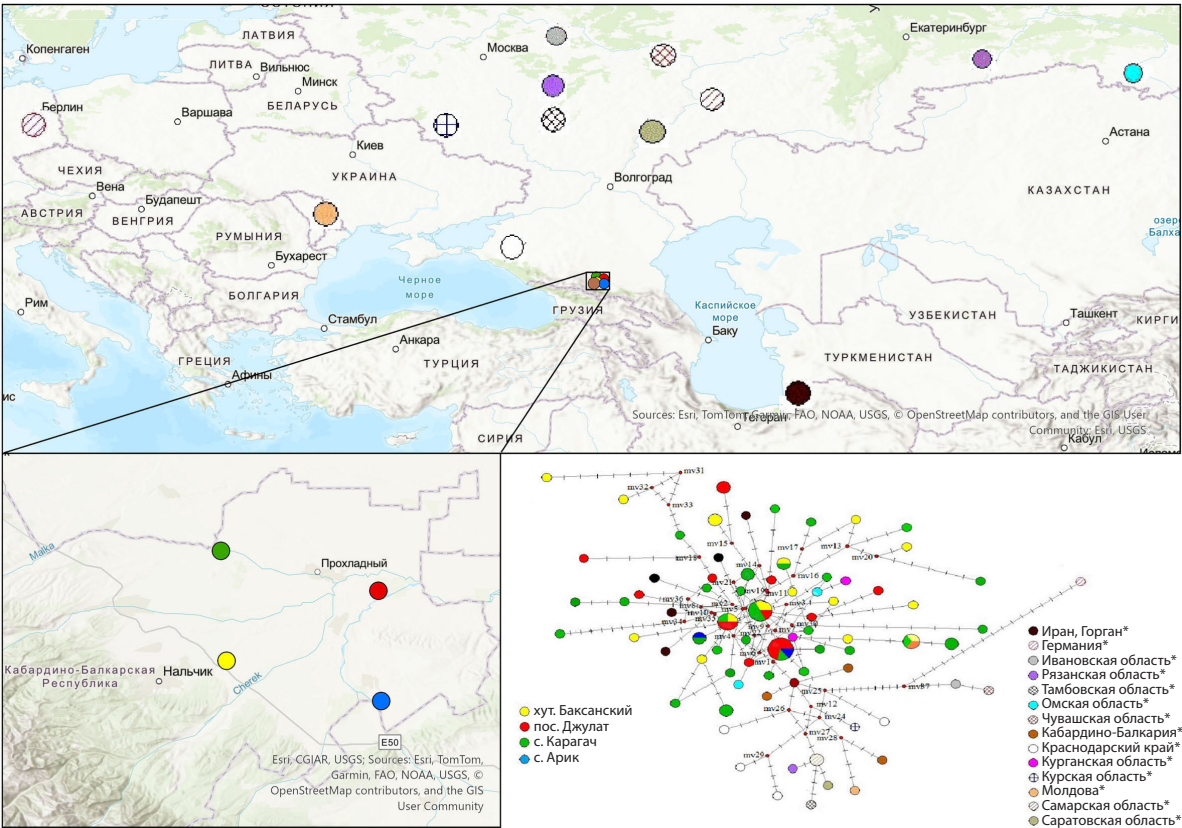
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx45.pdf>





**Рис. 2.** Байесовское филогенетическое дерево *A. uralensis*, основанное на анализе гаплотипов фрагмента гена *cyt b* мтДНК (948 п.н.).  
Здесь и на рис. 4 и 6: числа в узлах ветвления – значения апостериорных вероятностей; числа в квадратах – номера узлов. Звездочкой (\*) помечены гаплотипы из Генбанка.





**Рис. 3.** Медианная сеть гаплотипов *A. uralensis* на основании 73 последовательностей фрагмента гена *сyt b* длиной 948 п.н., полученных в этой работе, и 26 последовательностей из базы Генбанк.  
Здесь и на рис. 5 и 7: величина круга пропорциональна количеству идентичных гаплотипов; черточки обозначают мутации, mv – гипотетические гаплотипы. Звездочкой (\*) помечены гаплотипы из Генбанка.

**Таблица 1.** Показатели гаплотипического (h) и нуклеотидного (п) разнообразия и значения тестов Таджимы и Фу *A. uralensis* Центрального Предкавказья

| Географические группировки (размер выборки) | N  | π ± S.E.        | h ± S.E.      | Tajima's D | Fu's F |
|---------------------------------------------|----|-----------------|---------------|------------|--------|
| КБР, Прохладненский район                   |    |                 |               |            |        |
| Карагач (n = 34)                            | 30 | 0.0075 ± 0.0040 | 0.991 ± 0.010 | -1.731     | -22.74 |
| КБР, Майский район                          |    |                 |               |            |        |
| Баксанский (n = 16)                         | 15 | 0.0089 ± 0.0049 | 0.992 ± 0.025 | -1.146     | -6.655 |
| КБР, Терский район                          |    |                 |               |            |        |
| Джулат (n = 21)                             | 13 | 0.0044 ± 0.0025 | 0.929 ± 0.039 | -1.603     | -4.334 |
| Для <i>A. uralensis</i> (n = 73) в целом    | 50 | 0.0069 ± 0.0037 | 0.978 ± 0.008 | -2.015     | -25.10 |

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 5: N – число гаплотипов; S.E. – стандартная ошибка; КБР – Кабардино-Балкарская Республика. Статистически достоверные значения тестов выделены полужирным шрифтом.

стей *A. uralensis* европейской расы (рис. 3). Медианная сеть также демонстрирует отсутствие четкой обособленности гаплотипов мышей из различных регионов, в том числе и для включенных в анализ из базы Генбанк.  
У вида *A. uralensis* Центрального Предкавказья среди секвенированных 73 последовательностей описано 50 гаплотипов, 40 (80 %) из которых уникальные. Остальные 20 % гаплотипов встречены у 2–7 особей. Характерной особенностью медианной сети *A. uralensis* является большое количество альтернативных связей, возникающих

в результате обратных или параллельных мутаций (см. рис. 3).  
Генетические дистанции между географическими выборками *A. uralensis* степного Предкавказья тоже не выявили различий. Максимальная дистанция (K2P) при попарном сравнении четырех выборок (Карагач, Джулат, Баксанский и Арик) не превышала 0.06 %.  
Гаплотипическое разнообразие было достаточно высоким во всех выборках, нуклеотидное – варьировало от 0.0044 до 0.0089 (табл. 1). При этом наименьшие значения

**Таблица 2.** Время существования (млн лет) последнего общего предка (TMRCA) у основных клад *A. uralensis* по результатам анализа различий в последовательностях *сyt b*

| Номер узла на дереве. Род, вид                                              | 2.4 %      |                   | 3.1 %      |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
|                                                                             | Mean (Mya) | 95 % HPD Interval | Mean (Mya) | 95 % HPD Interval |
| 1. ingroup <i>Mus</i> + <i>Apodemus</i> + <i>Rattus</i>                     | 9.624      | 6.374–13.14       | 9.329      | 6.191–12.81       |
| 2. <i>Mus m. musculus</i> + <i>M. m. domesticus</i> / <i>M. macedonicus</i> | 1.726      | 1.087–2.439       | 1.692      | 1.059–2.381       |
| 3. <i>A. uralensis</i> 1 european race / <i>A. uralensis</i> 2 asian race   | 1.475      | 0.930–2.076       | 1.426      | 0.898–2.016       |
| 4. <i>A. uralensis</i> 1 european race                                      | 0.629      | 0.346–0.951       | 0.598      | 0.332–0.901       |
| 5. <i>A. uralensis</i> 2 asian race                                         | 0.252      | 0.121–0.424       | 0.236      | 0.108–0.401       |
| 6. <i>A. uralensis</i> 2.1 asian race                                       | 0.126      | 0.051–0.212       | 0.117      | 0.048–0.197       |
| 7. <i>A. uralensis</i> 1.1 european race                                    | 0.372      | 0.212–0.566       | 0.346      | 0.193–0.528       |
| 8. <i>A. uralensis</i> 1.2 european race                                    | 0.256      | 0.122–0.403       | 0.239      | 0.115–0.377       |

отмечались в выборке из пос. Джулат, наибольшие – из хут. Баксанский. Практически все исследованные нами выборки *A. uralensis* характеризовались достоверно отрицательными значениями тестов Фу и Таджimy на нейтральность эволюции.

#### Время дивергенции основных кластеров *A. uralensis*

Согласно нашим расчетам, разделение двух рас *A. uralensis* 1 и *A. uralensis* 2, т.е. европейской и азиатской, произошло примерно 1.475 млн лет назад (95 % HPD: 0.930–2.076) (табл. 2, узел 3), что не противоречит данным Г.Н. Челоминной и Д.М. Атопкина (2010), показавшим расхождение азиатской и европейской рас около 1.5 млн лет назад. Самый недавний общий предок европейской расы малой лесной мыши (*A. uralensis* 1) существовал более 600 тыс. лет назад (95 % HPD: 0.346–0.951) (см. табл. 2, узел 4), а азиатской (*A. uralensis* 2) – около 252 тыс. лет назад (95 % HPD: 0.121–0.424) (узел 5). Возраст кластера (*A. uralensis* 1.1), в который вошли почти все гаплотипы с Русской равнины и Центрального Предкавказья (от FN430769 до 3463), составил в среднем 400 тыс. лет (95 % HPD: 0.212–0.566) (узел 7), а возраст гаплогруппы *A. uralensis* 1.2, представленной только гаплотипами малой лесной мыши Центрального Предкавказья, – около 260 тыс. лет (узел 8).

#### Генетическая характеристика *A. flavicollis*

Филогенетическое дерево, полученное по результатам байесовского анализа, наглядно демонстрирует разделение гаплотипов *A. flavicollis* на два кластера с высоким значением апостериорной вероятности (рис. 4). Первый кластер, *A. flavicollis* 1, сформирован гаплотипами мышей из Ирана, Турции, Израиля, а также Центрального Предкавказья. Наиболее крупный второй кластер, *A. flavicollis* 2, включает три гаплогруппы: *A. flavicollis* 2.1, 2.2 и 2.3. В гаплогруппу *A. flavicollis* 2.1 вошли животные из Франции, Боснии и Герцеговины, Беларуси, Италии, Греции, Испании, Швеции, Турции, Чехии, Пиренейского полуострова, Германии, Македонии, Австрии, Швейцарии, Венгрии, России (Самара). Гаплогруппа *A. flavicollis* 2.2 представлена в основном гаплотипами мышей из России (Урал), Украины (Чернобыль), Македонии, Румынии,

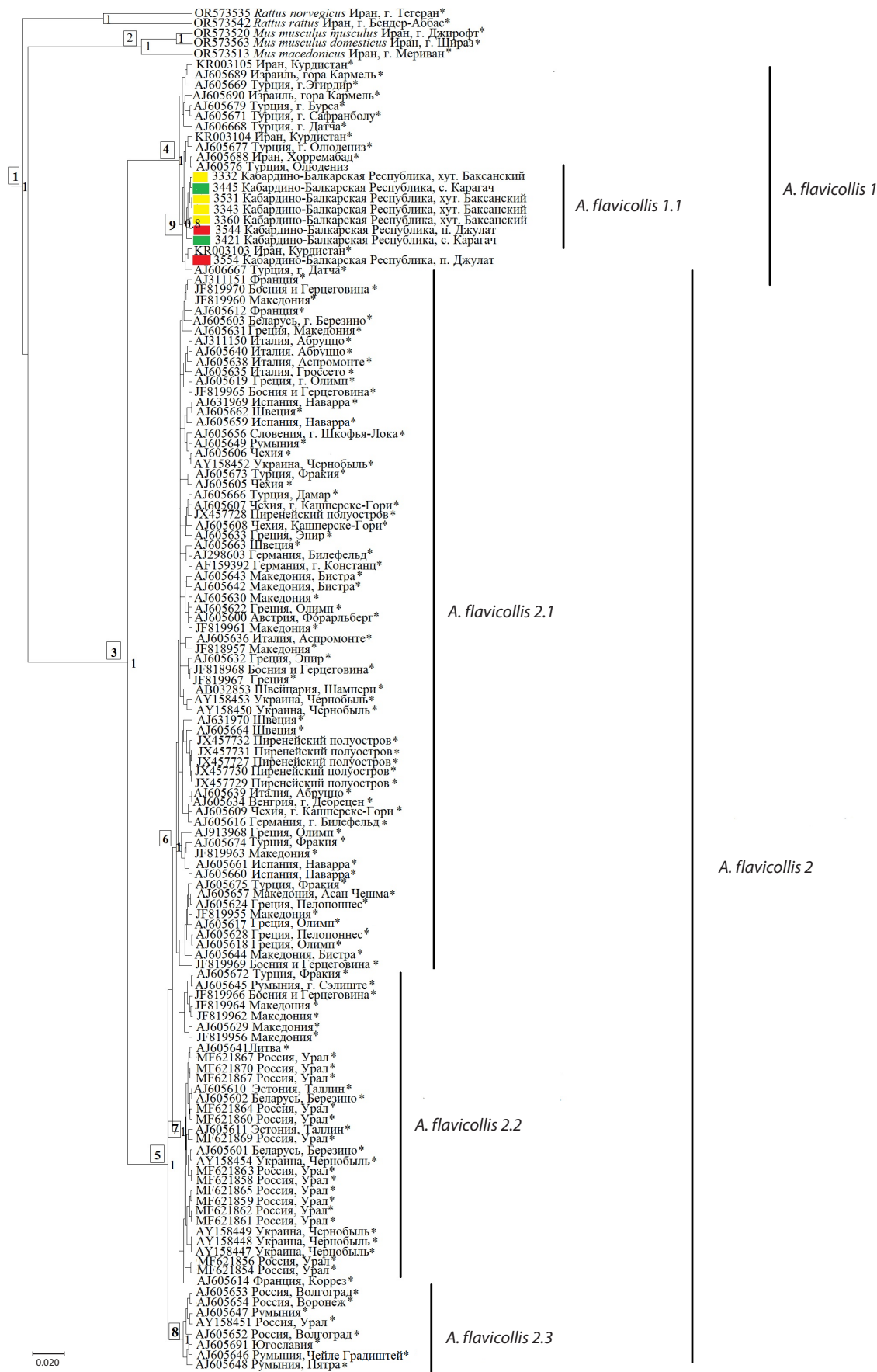
Литвы, Беларуси, Эстонии, Франции. Гаплогруппа *A. flavicollis* 2.3 объединила животных из России (Воронеж, Урал, Волгоград), Югославии и Румынии. Дистанция между кластерами *A. flavicollis* 1 и *A. flavicollis* 2 составила 5.3 %. Следует отметить, что таксономический статус *A. flavicollis* 1, распространение которого охватывает Грузию, Дагестан, Краснодарский край, Азербайджан, Армению, а также территории, граничащие с Кавказом (Турция, Иран), остается спорным.

На медианной сети (рис. 5), построенной с использованием дополнительных данных по 13 нуклеотидным последовательностям гомологичного участка мтДНК *A. flavicollis* из Ирана, Турции, Израиля, видно, что гаплотипы мышей Центрального Предкавказья представлены одним доминирующим гаплотипом и веером минорных по частоте встречаемости гаплотипов, отличающихся друг от друга на 1–4 нуклеотидные замены, что указывает на отсутствие подразделенности выборки.

Анализируемые 50 последовательностей фрагмента гена *сyt b* мтДНК сформировали 21 гаплотип. В исследуемом фрагменте анализ выявил наличие 41 варибельного сайта. Доминирующий гаплотип отмечен у 29 особей и присутствует во всех исследованных локалитетах: Арик, Джулат, Карагач и Баксанский. Из 37 гаплотипов отмеченной территории только шесть являются уникальными, что составляет всего 16 %. В целом сеть имеет достаточно разветвленную структуру со значительным числом медианных векторов, представляющих гипотетические, вероятно, предковые гаплотипы. При сравнении с последовательностями из Ирана и Турции (Генбанк) полностью идентичных гаплотипов не выявлено. Генетические дистанции при попарном сравнении выборок *A. flavicollis* равнялись нулю, что говорит об их принадлежности к одной популяции, а при их сравнении с группировкой из Ирана и Турции – 0.16 и 0.14 % соответственно.

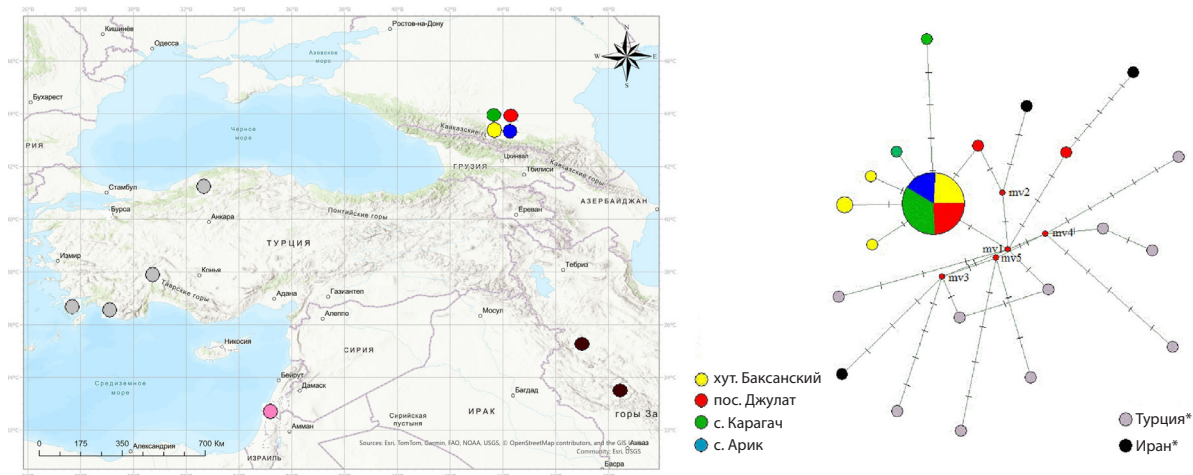
Обнаруженная нами филогенетическая структура, характеризующаяся небольшим количеством гаплотипов и их близостью, вероятно, свидетельствует о заселении исследуемой территории незначительным числом особей основателей, происходящих из единой предковой популяции.

В основном все выборки имели низкие значения нуклеотидного и гаплотипического разнообразия (табл. 3).



**Рис. 4.** Байесовское филогенетическое дерево *A. flavicollis*, основанное на анализе гаплотипов фрагмента гена *cyt b* мтДНК (870 п.н.).





**Рис. 5.** Медианная сеть гаплотипов *A. flavicollis* на основании 37 последовательностей фрагмента гена *cyt b*, полученных в данной работе, и 13 последовательностей из базы Генбанк.

**Таблица 3.** Показатели гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия и значения тестов Таджимы и Фу *A. flavicollis* Центрального Предкавказья

| Географические группировки (размер выборки) | N | π ± S.E.        | h ± S.E.      | Tajima's D | Fu's F |
|---------------------------------------------|---|-----------------|---------------|------------|--------|
| КБР, Прохладненский район                   |   |                 |               |            |        |
| Карагач (n = 12)                            | 3 | 0.0009 ± 0.0008 | 0.318 ± 0.164 | -1.831     | 0.325  |
| КБР, Майский район                          |   |                 |               |            |        |
| Баксанский (n = 11)                         | 4 | 0.0008 ± 0.0007 | 0.636 ± 0.128 | -1.451     | -1.256 |
| КБР, Терский район                          |   |                 |               |            |        |
| Джулат (n = 9)                              | 4 | 0.0014 ± 0.0011 | 0.583 ± 0.183 | -1.728     | -0.450 |
| Арик (n = 5)                                | 1 | 0               | 0             |            |        |
| Для <i>A. flavicollis</i> (n = 37) в целом  | 9 | 0.0008 ± 0.0007 | 0.431 ± 0.102 | -2.452     | -5.951 |

**Таблица 4.** Время существования (млн лет) последнего общего предка (TMRCA) у основных клад *A. flavicollis* по результатам анализа различий в последовательностях *cyt b*

| Номер узла на дереве. Род, вид                                              | 2.4 %      |                   | 3.1 %      |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
|                                                                             | Mean (Mya) | 95 % HPD Interval | Mean (Mya) | 95 % HPD Interval |
| 1. ingroup <i>Mus</i> + <i>Apodemus</i> + <i>Rattus</i>                     | 9.744      | 6.518–13.47       | 9.509      | 6.334–13.14       |
| 2. <i>Mus m. musculus</i> + <i>M. m. domesticus</i> / <i>M. macedonicus</i> | 1.754      | 1.088–2.480       | 1.727      | 1.076–2.420       |
| 3. <i>A. flavicollis</i> 1 / <i>A. flavicollis</i> 2                        | 2.007      | 1.218–2.926       | 1.951      | 1.159–2.814       |
| 4. <i>A. flavicollis</i> 1                                                  | 0.303      | 0.123–0.525       | 0.281      | 0.119–0.492       |
| 5. <i>A. flavicollis</i> 2                                                  | 0.638      | 0.304–1.060       | 0.599      | 0.288–1.011       |
| 6. <i>A. flavicollis</i> 2.1                                                | 0.322      | 0.186–0.478       | 0.300      | 0.176–0.446       |
| 7. <i>A. flavicollis</i> 2.2                                                | 0.254      | 0.109–0.427       | 0.236      | 0.104–0.402       |
| 8. <i>A. flavicollis</i> 2.3                                                | 0.169      | 0.050–0.332       | 0.157      | 0.045–0.309       |
| 9. <i>A. flavicollis</i> 1.1                                                | 0.100      | 0.019–0.268       | 0.085      | 0.017–0.195       |

Отмеченные показатели в суммарной выборке *A. flavicollis* тоже были низкими. Для выборки из с. Арик получены нулевые значения, так как она была мономорфна, что, возможно, связано с ее небольшим объемом. Практически во всех выборках наблюдаются достоверно отрицательные значения тестов Таджимы и Фу. В суммарной выборке оба теста на нейтральность также оказались достоверно отрицательными.

**Время дивергенции основных кластеров *A. flavicollis***  
Разделение *A. flavicollis* 1 / *A. flavicollis* 2 произошло около 2 млн лет назад (табл. 4). Возраст недавнего общего предка кластера *A. flavicollis* 1, включающего гаплотипы с территории Ирана, Турции, Израиля, а также Центрального Предкавказья, составляет примерно 300 тыс. лет (95 % HPD: 0.123–0.525) (см. табл. 4, узел 4).

Возраст недавнего общего предка кластера *A. flavicollis* 1.1, представленного только гаплотипами мышей Центрального Предкавказья, составил в среднем 100 тыс. лет (95 % HPD: 0.019–0.268) (см. табл. 4, узел 9). В пределах более крупного кластера *A. flavicollis* 2, объединяющего гаплотипы из всех регионов Западной Палеарктики, включая западные (Франция), северные (Швеция) и Восточной Европы до Украины, а также трех средиземноморских полуостровов (Испания, Италия и Балканы), выделилось несколько группировок с разным эволюционным возрастом. Возраст кластера *A. flavicollis* 2 составил около 640–600 тыс. лет (узел 5), а гаплогрупп *A. flavicollis* 2.1, *A. flavicollis* 2.2 и *A. flavicollis* 2.3 варьировал в пределах от 330 до 160 тыс. лет (узлы 6–8).

**Генетическая характеристика *A. witherbyi***  
Все анализируемые нами гаплотипы *A. witherbyi* сформировали один крупный кластер *A. witherbyi* 1, в который вошли гаплотипы из Ирана, Израиля, Турции и Центрального Предкавказья (рис. 6). В пределах данного кластера выделились две гаплогруппы, представленные только животными Центрального Предкавказья: *A. witherbyi* 1.1 с низким значением апостериорной вероятности (>0.6) и *A. witherbyi* 1.2 с высоким значением (0.9).  
Медианная сеть *A. witherbyi* характеризуется достаточно сложной структурой, с большим числом гипотетических гаплотипов, через которые мог происходить переход от одного гаплотипа в другой. Всего описано 36 гаплотипов, из которых два являются доминирующими (рис. 7). Большая

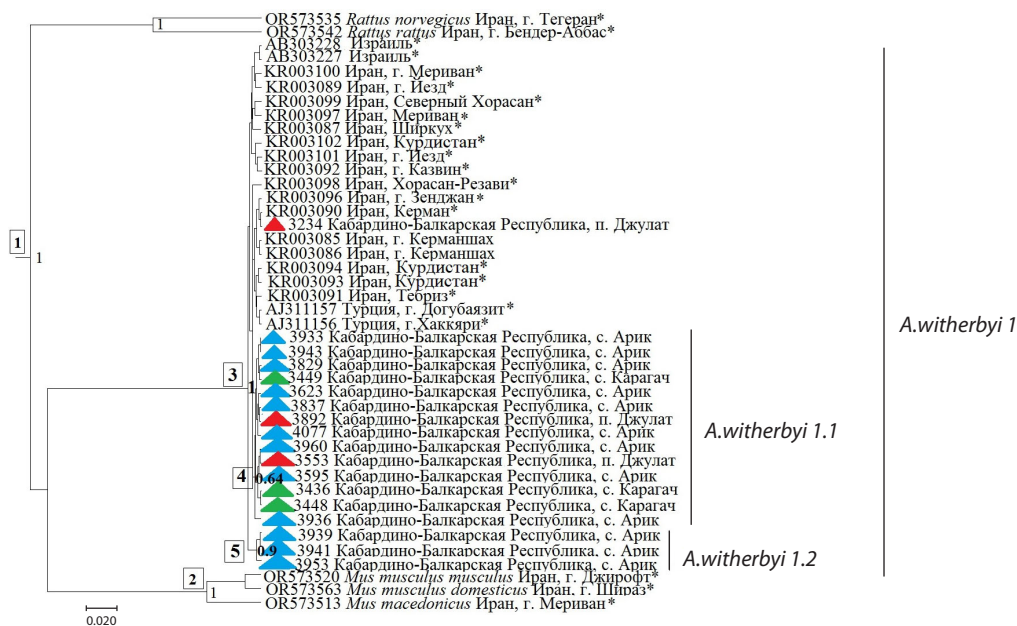


Рис. 6. Байесовское филогенетическое дерево *A. witherbyi*, основанное на анализе гаплотипов фрагмента гена *cyt b* мтДНК (870 п.н.).

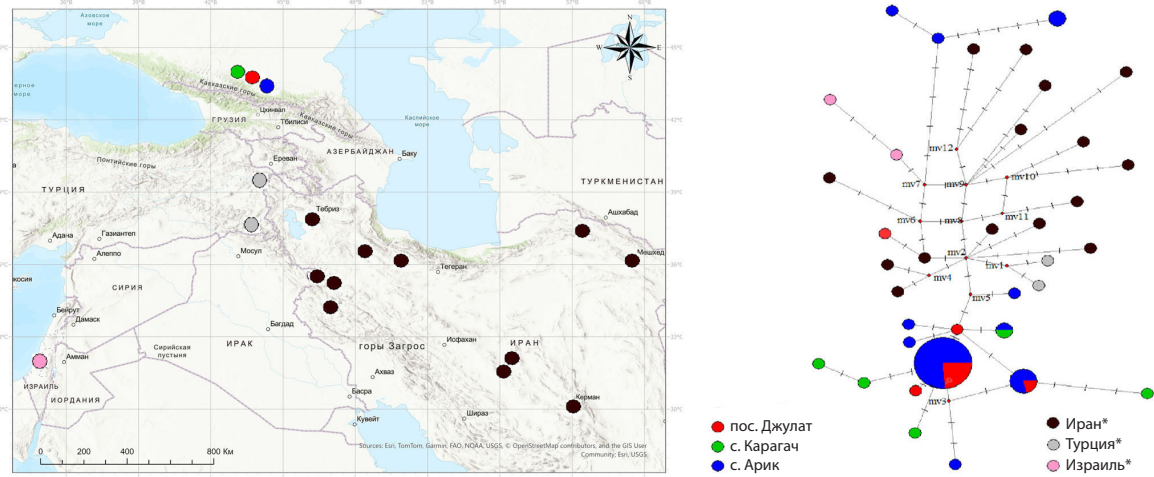


Рис. 7. Медианная сеть гаплотипов *A. witherbyi* на основании 43 последовательностей фрагмента гена *cyt b*, полученных в данной работе, и 19 последовательностей из базы Генбанк.

**Таблица 5.** Показатели гаплотипического (h) и нуклеотидного (π) разнообразия и значения тестов Таджимы и Фу *A. witherbyi* Центрального Предкавказья

| Географические группировки (размер выборки) | N  | π ± S.E.        | h ± S.E.      | Tajima's D | Fu's F  |
|---------------------------------------------|----|-----------------|---------------|------------|---------|
| КБР, Прохладненский район                   |    |                 |               |            |         |
| Карагач (n = 4)                             | 4  | 0.0052 ± 0.0038 | 1.000 ± 0.177 | 0.1843     | -0.5235 |
| КБР, Терский район                          |    |                 |               |            |         |
| Джулат (n = 9)                              | 5  | 0.0016 ± 0.0012 | 0.722 ± 0.159 | -1.398     | -1.504  |
| Арик (n = 30)                               | 12 | 0.0041 ± 0.0023 | 0.715 ± 0.089 | -1.270     | -1.220  |
| Для <i>A. witherbyi</i> (n = 43) в целом    | 18 | 0.0037 ± 0.0021 | 0.759 ± 0.069 | -1.720     | -5.616  |

**Таблица 6.** Время существования (млн лет) последнего общего предка (TMRCA) у основных клад *A. witherbyi* по результатам анализа различий в последовательностях *cyt b*

| Номер узла на древе. Род, вид                                               | 2.4 %      |                   | 3.1 %      |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
|                                                                             | Mean (Mya) | 95 % HPD Interval | Mean (Mya) | 95 % HPD Interval |
| 1. ingroup <i>Mus</i> + <i>Apodemus</i> + <i>Rattus</i>                     | 9.150      | 6.397–12.118      | 8.684      | 5.995–11.54       |
| 2. <i>Mus m. musculus</i> + <i>M. m. domesticus</i> / <i>M. macedonicus</i> | 1.706      | 1.149–2.295       | 1.641      | 1.102–2.233       |
| 3. <i>A. witherbyi</i> 1                                                    | 0.354      | 0.200–0.530       | 0.330      | 0.184–0.503       |
| 4. <i>A. witherbyi</i> 1.1                                                  | 0.166      | 0.071–0.292       | 0.154      | 0.064–0.268       |
| 5. <i>A. witherbyi</i> 1.2                                                  | 0.125      | 0.031–0.245       | 0.115      | 0.027–0.029       |

же часть гаплотипов (32 из 36) – уникальные. Наиболее распространенный гаплотип отмечен у 21 особи (48.8 %) Джулата и Карагача, а второй по частоте встречаемости гаплотип – у 5 особей из тех же локалитетов. Таким образом, распределение гаплотипов у данного вида, как и у других, не ассоциировано с географической локализацией.

Генетические дистанции между исследованными выборками были очень низкими и не превышали 0.0009. Суммарная выборка из Предкавказья отличалась от выборки из Ирана с дистанцией 0.0017, Турции – 0.0028, Израиля – 0.0035.

В контексте отдельных групп максимальные значения как гаплотипического, так и нуклеотидного разнообразия наблюдались у *A. witherbyi* из окрестностей с. Карагач (табл. 5). Выборки из пос. Джулат и с. Арик характеризовались близкими значениями гаплотипического разнообразия при более высоком нуклеотидном разнообразии во второй выборке. В целом для вида отмечены невысокие значения обоих показателей:  $h = 0.759$ ,  $\pi = 0.0037$ .

#### Время дивергенции основных клад *A. witherbyi*

Возраст кластера *A. witherbyi* 1, представленного гаплотипами с территории Израиля, Ирана, Турции и Центрального Предкавказья, составляет в среднем около 350–330 тыс. лет (95 % HPD: 0.200–0.530 и 0.184–0.503 соответственно) (табл. 6, узел 3). На территории Центрального Предкавказья выделились две гаплогруппы: *A. witherbyi* 1.1 с низким значением апостериорной вероятности и *A. witherbyi* 1.2 – с высоким. Самый недавний общий предок гаплогруппы *A. witherbyi* 1.1 существовал в период 166–154 тыс. лет назад (95% HPD: 0.071–0.292) (см. табл. 6, узел 4), а *A. witherbyi* 1.2 – примерно 125–115 тыс. лет назад (95 % HPD: 0.031–0.245) (узел 5).

#### Биотопическое распределение и численность представителей рода *Apodemus* Центрального Предкавказья

В условиях Центрального Предкавказья в степных районах (Майский, Терский и Прохладненский) выявлено почти повсеместное симпатрическое, местами симбиотопическое обитание представителей рода *Apodemus* – *A. uralsensis*, *A. witherbyi*, *A. flavicollis*, за исключением Майского района, где не регистрируется *A. witherbyi*. Все три вида рода *Apodemus* встречаются во всех биотопах: в лесу, лесозащитной полосе, на берегах оросительного канала и на открытых стациях, луговых участках – целинных землях, неудобьях между агроценозами. Однако относительно района исследования, наряду с симбиотопическим обитанием видов, отмечается разделение ими мест обитания и наибольшее или наименьшее тяготение видов к тем или иным биотопам.

Численность видов варьирует относительно типа местообитания, года и сезона. Так, у малой лесной мыши значения колеблются от обычного до многочисленного (1–18.1 ос./100 л. с.). Встречается в окрестностях хут. Баксанский Майского района в лесозащитных полосах с дубом черешчатым и на береговой линии оросительных каналов со злаково-бобовым фитоценозом, где численность в отдельные годы достигает 8.3 и 10.6 ос./100 л. с. соответственно. Относительная численность малой лесной мыши в изученных биотопах составила в среднем (ос./100 л. с.): в лесу – 4.9–9.6, лесополосе – 8.3, на берегу оросительного канала – 1.4–6.6, на лугу – 4.2.

Желтогорлая мышь регистрируется во всех биотопах исследованной территории. В лесах и лесополосах окрестностей хут. Баксанский и с. Карагач относительная численность вида достигает максимальных значений: 14 и



14.8 ос./100 л. с. соответственно. На берегу оросительных каналов со злаково-бобовым фитоценозом окрестностей хут. Баксанский и с. Арик вид обычен. Средние значения относительной численности желтогорлой мыши составили (ос./100 л. с.): в лесу – 2.6–7.6, лесополосе – 8.8, на берегу оросительного канала – 1.9–4.9, на лугу – 1.7.

Третий вид рода *Apodemus* – степная мышь, представлен во всех изученных биотопах исследованных районов, за исключением Майского. *A. witherbyi* наиболее приурочена к луговым, целинным участкам, неудобным для вспашки, с полынно-злаково-разнотравными фитоценозами, где ее относительная численность варьирует от 1.7 до 4.2 ос./100 л. с. Вместе с тем в лесозащитной полосе в окрестностях с. Арик численность вида достигает максимальных показателей.

## Обсуждение

### Генетическая структура представителей рода *Apodemus*

На основании анализа изменчивости фрагмента гена *cyt b* митохондриальной ДНК впервые изучены видовой состав и генетическое разнообразие видов-двойников лесных мышей рода *Apodemus* степной зоны Центрального Предкавказья. Молекулярно-генетическими методами выявлено обитание на обозначенной территории трех видов рода: *A. uralensis*, *A. flavicollis* и *A. witherbyi* с генетическими дистанциями от 10 до 13 %. При этом максимальный уровень различий наблюдался при сравнении *A. witherbyi* с двумя другими таксонами, *A. uralensis* и *A. flavicollis*. Внутривидовые генетические дистанции у исследуемых таксонов оказались минимальными и не превышали 0.06 %.

Среди трех видов *A. uralensis* выделяется наибольшим генетическим разнообразием (см. табл. 1). *A. witherbyi* занимает промежуточное положение (см. табл. 5), а самым низким уровнем молекулярно-генетической изменчивости характеризуется *A. flavicollis* (см. табл. 3). Включение в анализ подходящих по длине последовательностей из базы Генбанк не выявило полностью идентичных гаплотипов у всех трех изучаемых таксонов.

Для сравнения отметим, что в ранее исследованных выборках *A. flavicollis* из Западного и Восточного Кавказа гаплотипическое разнообразие варьировало от 0.867 до 0.978, нуклеотидное – от 0.0044 до 0.0051, а в совокупной выборке эти показатели составили 0.918 и 0.0050 соответственно (Amshokova et al., 2024). Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в суммарной выборке *A. flavicollis* Центрального Предкавказья ниже полученных нами ранее. Отрицательные и значимые величины тестов Таджимы и Фу, наблюдаемые в суммарной выборке, являются доказательством экспансии популяции *A. flavicollis*. Доминирующий гаплотип *A. flavicollis* встречается во всех географических выборках у 78.3 % особей. Подобная структура медианной сети, а также показатели генетического разнообразия, вероятно, свидетельствуют о недавнем заселении изучаемой территории ограниченным числом особей основателей, несущих массовый гаплотип. Отсутствие генетических различий между четырьмя выборками также подтверждает общность происхождения.

В отличие от *A. flavicollis*, *A. uralensis* характеризуется наиболее сложной структурой гаплотипической сети и самыми высокими значениями индексов гаплотипического и нуклеотидного разнообразия (см. рис. 3). В данном случае мы наблюдаем наличие множества альтернативных связей разной длины, которые являются результатом обратных или параллельных мутаций, приводящих к образованию множественных замкнутых циклов. У *A. uralensis*, как и у других видов, распределение гаплотипов не демонстрирует четкой достоверной связи с географической локализацией выборок. Такая структура сети, наряду с высокими значениями гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, свидетельствует о длительной эволюции популяций в стабильных условиях, что, вероятно, указывает на значительный обмен генами с соседними территориями.

Сравнение уровня генетической изменчивости *A. uralensis* с известными литературными данными позволяет говорить об относительно высоком уровне генетического разнообразия, характерного в целом для вида. Подобные результаты получены и другими авторами при анализе участка гена *cyt b* *A. uralensis* Кабардино-Балкарской Республики ( $h = 1.000$ ,  $\pi = 0.0131$ ), Краснодарского края ( $h = 0.900$ ,  $\pi = 0.0079$ ) (Челомина, Атопкин, 2010) и Нижнего Дона ( $h = 0.933$ ,  $\pi = 0.0056$ ) (Стахеев, 2024).

Совокупная выборка *A. witherbyi* занимает промежуточное положение по уровню генетической изменчивости среди изучаемых представителей рода *Apodemus*. По сравнению с приводимыми в литературе сведениями, вид на исследуемой территории характеризуется более низкими значениями генетического разнообразия. Так, согласно данным зарубежных авторов (Shad et al., 2016), в суммарной выборке *A. witherbyi* из Ирана гаплотипическое разнообразие составило 0.914, нуклеотидное – 0.0043. Относительно низкое генетическое разнообразие *A. witherbyi* Центрального Предкавказья, вероятно, связано с поздним вселением вида на изучаемую территорию.

### Время дивергенции основных клад представителей рода *Apodemus*

Видообразование внутри подрода *Sylvaemus* происходило в период 1.2–5.7 млн лет назад, т. е. в плиоцене-плейстоцене, а его дивергенция с родом *Apodemus* – более 7.5 млн лет назад, еще в миоцене (Челомина, Сузуки, 2006).

По результатам проведенного нами молекулярного датирования, разделение двух рас *A. uralensis* – европейской и азиатской – произошло около 1.5 млн лет назад (95 % НРД: 0.929–2.076) (см. рис. 2, табл. 2), что согласуется с данными Г.Н. Челоминой и Д.М. Атопкина (2010).

Время дивергенции между *A. flavicollis* 1, выделяемым одними авторами в качестве самостоятельного вида (*A. ponticus* (Богданов и др., 2012)), а другими – как подвид (*A. flavicollis ponticus* (Громов, Ербаева, 1995)), и *A. flavicollis* 2 составляет около 2 млн лет (см. рис. 4). Полученные нами данные близки к результатам зарубежных исследователей (Michaux et al., 2004), показавших разделение клад 1 (Турция, Иран, Израиль) и клад 2, включающей все популяции Западной Палеарктики от Пиренейского полуострова на западе до юга России (Са-

мара) на востоке и Эстонии на севере, 2.2–2.4 млн лет назад. J.R. Michaux с коллегами (2004) подобную структуру дерева объясняли изоляцией двух групп *A. flavicollis* в двух разных рефугиумах: первый – в районе Ближнего Востока, второй – в Балканском регионе во время одного из первых четвертичных климатических колебаний. По их мнению, вся территория Западной Палеарктики была реколонизирована не из ближневосточной, а из балканской популяции, что предположительно связано с наличием сильных биогеографических барьеров, таких как Черное море и Кавказ, которые препятствовали контакту палеарктических и ближневосточных животных.

Разделение между *A. witherbyi* и остальными близкородственными видами произошло 6 млн лет назад (Darvish et al., 2015).

Прежде чем переходить к обсуждению полученного материала по эволюционному возрасту мышей рода *Apodemus* на Центральном Предкавказье, необходимо привести некоторые узловые моменты в эволюции самого Кавказа, представляющего собой перешеек между Европой и Азией. По данным литературы, около 1.8–0.7 млн лет назад в эоплейстоцене (средний плейстоцен) Кавказ представлял собой полуостров, который омывало Апшеронское море, существовавшее на территории современного Черноморья, Азова, Каспия, Арала, нижнего Поволжья, Туркменистана и Казахстана. В этот период фауны, в том числе млекопитающих, имели тесную связь с таковыми Малой Азии через Закавказье. Образование перешейка шло в результате неоднократного объединения морских бассейнов Понта и Каспия в плейстоцене. Так, А.А. Свиточ и В.М. Соболев (2011) при изучении плейстоценовых проливов Маныча, являющегося естественной границей Русской равнины и Северного Кавказа, выделяют следующие периоды смыкания Понта и Каспия в плейстоцене.

1. Во второй половине раннего (нижнего) плейстоцена (гелазский век, 2.58–1.80 млн лет назад, согласно российской стратиграфической шкале, утвержденной в марте 2024 г.) существовал Бакинский (позднечаудинский) пролив, по которому происходил сброс вод бакинской трансгрессии Каспия в позднечаудинский водоем Понта.
2. В середине среднего плейстоцена (эоплейстоцен, 1.80–0.781 млн лет назад) отмечается второе соединение Каспийского и Черноморского бассейнов, в результате которого образовался Раннехазарский пролив, что было определено высоким уровнем раннехазарской трансгрессии Каспия и переливом ее вод в Понт.
3. В начале позднего (верхнего) плейстоцена (неоплейстоцен, 0.781–0.129 млн лет назад) в Манычской депрессии возник Позднехазарский (карангатский) пролив, обусловленный крупнейшей карангатской трансгрессией Понта и сравнительно небольшой позднехазарской трансгрессией Каспия.
4. В середине позднего плейстоцена, после регрессии карангатского и позднехазарского бассейнов, в Манычской депрессии существовал обширный пресноводный водоем. Озеро занимало всю низменную часть впадины, заполняя ложбины древних проливов. По сравнению с предшествующим позднехазарским (карангатским) проливом озеро имело большие площадь и глубину.

Суммируя приведенные сведения по палеогеографии Понта, Каспия и Маныча, можно предполагать, что проникновение фауны млекопитающих с Русской равнины на Северный Кавказ периодически происходило в неоплейстоцене после 780 тыс. лет назад.

Не менее интересны и важны, помимо истории становления современной территории Кавказа, палеонтологические данные А.К. Марковой (2016), изучавшей фауну мелких млекопитающих Европы, в том числе и Восточной, первой половины среднего плейстоцена в интервале 0.76–0.42 млн лет назад, а затем и второй его половины в интервале 0.424–0.130 млн лет назад (Маркова, 2017). Согласно российской стратиграфической шкале, эти интервалы соответствуют позднему плейстоцену (неоплейстоцену). По мнению автора, в первой половине среднего плейстоцена останки мышей рода *Apodemus* из 26 разрезов на территории европейской части России и Беларуси были обнаружены только в двух разрезах: *Apodemus* cf. *flavicollis* – в Беларуси (местонахождение Корчëво), останки *Apodemus* ex gr. *sylvaticus* – в Тамбовской области (местонахождение Кузнецовка). Из 35 изученных разрезов европейской части России во второй половине среднего плейстоцена (~0.424–0.130 млн лет назад) останки *Apodemus* ex gr. *sylvaticus* были обнаружены лишь в одном разрезе (Тульская область, местонахождение Чекалин). Здесь стоит уточнить, что, по современной таксономии, в европейской части России (Громов, Ербаева, 1995) и на Северном Кавказе (Темботова, 2015) обитает *A. uralensis*. Из работ А.К. Марковой (2016, 2017) можно заключить, что мыши рода *Apodemus* в европейской части России в среднем плейстоцене не имели широкого распространения и высокой численности (в разрезах оба вида представлены незначительным количеством останков). Это согласуется и с утверждением Н.К. Верещагина (1959) об отсутствии палеонтологических материалов из плейстоценовых отложений на Кавказе. Так, например, *Apodemus agrarius* Pallas (1771) известна на Кавказе только из верхнечетвертичных отложений низового Дона. По другим видам рода автор никакой информации не приводит, так же как и по представителям других двух близких родов: *Rattus* и *Mus* семейства Muridae Illiger (1811).

Таким образом, палеонтологические данные А.К. Марковой (2016, 2017) по мелким млекопитающим европейской части России позволяют предполагать, что только в середине позднего плейстоцена (неоплейстоцен), менее 400 тыс. лет назад, соответствующего оптимуму лихвинского межледникового (350–300 тыс. лет назад), появилась возможность проникновения европейской фауны в Предкавказье с Русской равнины.

Переходя к эволюционному возрасту трех видов мышей (*A. uralensis*, *A. witherbyi*, *A. flavicollis*) исследуемой территории, в контексте изложенного можно отметить следующее. Как отражено в результатах, гаплотипы *A. uralensis* Центрального Предкавказья не образуют обособленного кластера с высоким уровнем поддержки, тем не менее некоторая структурированность выражена. В этой связи возраст рассчитывался для кластера, объединяющего гаплотипы из Центрального Предкавказья и Русской равнины, куда попали и три гаплотипа из Ирана.

Время формирования данной митохондриальной клады *A. uralensis* приходится примерно на 370–350 тыс. лет (см. рис. 2, узел 7), что соответствует так называемому среднему неоплейстоцену. Кластер, представленный только гаплотипами *A. uralensis* Центрального Предкавказья (см. рис. 2, узел 8), более молодой, его возраст примерно 256 тыс. лет, что соответствует позднему неоплейстоцену. Учитывая, что между Русской равниной и Северным Кавказом в районе Маныча регулярно появлялась непреодолимая водная преграда, малая лесная мышь проникала на Северный Кавказ как минимум в два этапа.

Возраст недавнего общего предка (MRCA) гаплогруппы *A. witherbyi* 1.1 Центрального Предкавказья приходится на период 166–154 тыс. лет назад, а *A. witherbyi* 1.2 – на 125–115 тыс. лет назад. Отсутствие последовательностей гена *cyt b* в базе Генбанк из других территорий распространения *A. witherbyi* не позволяет делать каких-либо предположений о возможных путях проникновения вида на территорию Центрального Предкавказья. По результатам исследования, степная мышь, скорее всего, попала на Северный Кавказ в два этапа: поздний неоплейстоцен и ранний голоцен.

Согласно данным, полученным для кавказской лесной мыши, возраст недавнего общего предка гаплогруппы *A. flavicollis* 1, представленной только гаплотипами мышей Центрального Предкавказья, составил примерно 100–85 тыс. лет. Из этого следует, что *A. flavicollis* – самый молодой вселенец на Центральном Предкавказье, его эволюционный возраст соответствует среднему голоцену. Изменчивость мтДНК свидетельствует о близком родстве с представителями Малой Азии, это дает основание полагать, что на Кавказ мышь проникла через Черноморское побережье из Турции, что согласуется с палеонтологическими сведениями А.С. Тесакова (2021) по Черноморскому побережью.

### Распространение и биотопическая приуроченность представителей рода *Apodemus*

Ареал *A. witherbyi* простирается от Главного Кавказского хребта на север до Дона и Кума-Манычской впадины, известен на территории почти всех административных и государственных единиц – Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского края, Адыгеи, Северной Осетии, Ингушетии, Ичкерии, Дагестана и Кабардино-Балкарии (Загороднюк и др., 1997). Касательно желтогорлой мыши, обитающей на Кавказе, существуют две точки зрения: одни авторы выделяют ее как самостоятельный вид, другие – как подвид. *Sylvaemus flavicollis ponticus* – эндемик Кавказских гор, распространена в широколиственных лесах Предкавказья, Кавказа и Закавказья (Павлинов, Лисовский, 2012). Что касается *A. uralensis*, электрофоретически типированные экземпляры описаны практически повсеместно на Кавказе и в Закавказье (Воронцов, 1992), а также в европейской части России (Челомина, Атопкин, 2010; Stakheev et al., 2011).

Относительно биотопического предпочтения исследуемых видов есть разные точки зрения. Так, Е.И. Лашкова и И.И. Дзевеверин (2004) считают малую лесную мышь самым полиморфным видом, биотопическую и географическую

приуроченность которого охарактеризовать сложно. В зависимости от региона биотопические предпочтения значительно изменяются. В одних частях ареала *A. uralensis* явно избегает леса, предпочитая открытые станции – сухие кустарники и даже участки степной целины, а в других, наоборот, придерживается лесов и влажных участков с густой растительностью, избегая сухих открытых мест. Одним из факторов, определяющих биотопическое распределение вида на Кавказе, является влажность. Вид избегает засушливые станции, уступая место *S. arianus* (степная мышь) = *A. witherbyi*. Встречается в равнинных и горных лесах, на луговинах, в зарослях тростника по берегам водоемов, садах и огородах (Центр охраны дикой природы, <https://biodiversity.ru>). Многочисленна малая лесная мышь в темнохвойных горных лесах Кавказа на каменистых россыпях, где обитает в симбиотопии с гудаурской полевкой. Ранее проведенные исследования в условиях Северного Кавказа также показали, что среди обитающих на отмеченной территории трех видов лесных мышей – *A. uralensis*, *A. witherbyi*, *A. flavicollis*, первый характеризуется наиболее широким распространением, встречаясь во всех исследованных биотопах, за исключением ксерофитных ландшафтов ООПТ Восточного Кавказа и Ростовской области, где не регистрируется (Gudova et al., 2021; Amshokova et al., 2024). Ареал малой лесной мыши растянут в высотном, долготном и широтном направлениях.

В условиях степных районов Центрального Предкавказья *A. uralensis* имеет широкое распространение, заселяя все изученные биотопы. Вид занимает значительную долю в уловах: так, из 153 генетически датированных зверьков 72 (47 %) относились к данному таксону. Наиболее тяготеет к лесным массивам, больше половины (~65 %) отловлены в дубово-тополево-лесу окрестностей с. Карагач, где отмечаются максимальные показатели; вид многочислен и в кленово-вязовом лесу в окрестностях пос. Джулат. Вместе с тем малая лесная мышь избегает ксерофитных участков; единожды за все годы исследований на Центральном Предкавказье зарегистрирована на степном злаково-разнотравном биотопе (луг), прилегающем к агроценозу, в окрестностях с. Карагач.

Отмечается симпатрическое и почти повсеместное симбиотопическое обитание с малой лесной мышью желтогорлой мыши. Несмотря на то что *A. flavicollis* встречается во всех районах Центрального Предкавказья, наиболее предпочитаемыми биотопами являются равнинные леса и лесополосы, представляющие собой смешанные древесные насаждения из дуба черешчатого и тополя дельтовидного, где в окрестностях хут. Баксанский и с. Карагач добыта значительная часть зверьков (25 %). Как и малая лесная мышь, кавказская лесная мышь избегает лугов, целинных степных участков, прилегающих к агроценозу. Единственная особь зарегистрирована в окрестностях пос. Джулат на открытой станции – целинном участке между агроценозами. В целом *A. flavicollis* – мезофильный вид, оптимум ареала которого приурочен к буковым лесам (Amshokova et al., 2024).

По мнению ряда авторов, для желтогорлой мыши самый характерный биотоп – широколиственный лес, где семена



бука, граба, дуба и некоторых кустарников составляют основную часть ее рациона. Высокой численности достигает и в горных буковых лесах, обитает также в смешанных лесах при наличии широколиственных пород (Попов, 1960; Млекопитающие..., 1963; Татаринов, 1973; Павлинов, 2002). На Кавказе желтогорлая мышь встречается в широколиственных лесах, в Алазанской долине отмечена и в сухих мелколиственных лесах (Воронцов и др., 1992); в Краснодарском крае и в Республике Адыгея кавказская лесная мышь тяготеет к низкогорным высокопродуктивным орехоплодным широколиственным лесам (бук, граб, дуб, каштан) (Окулова и др., 2007).

Генетическое исследование мышей Северного Кавказа также показало, что *A. flavicollis* приурочена к лесным (широколиственным) ландшафтам Западного и Восточного Кавказа. В предгорьях и среднегорьях Центрального Кавказа вид не обнаружен (Amshokova et al., 2024).

*A. witherbyi*, хотя представлен во всех изученных биотопах Терского района (окрестности с. Арик, пос. Джулат), где в лесополосах достигает высокой численности, в Прохладненском районе (окрестности с. Карагач) регистрируется исключительно на открытых стациях – луговых участках, в лесу не отмечен. Доля вида в общем улове составляет 28 %. Нередко приурочен к сухим местообитаниям.

В Предкавказье степная мышь обитает в открытых и опушечных биотопах, на полях, на Северном Кавказе и в Закавказье – в остепненных местообитаниях, включая участки степи, по окраинам широколиственных лесов, в зарослях кустарников (Загороднюк и др., 1997; Стахеев, 2024). Из полученных нами ранее данных также сделано заключение, что степная мышь является стенобиотомом, населяющим ксерофитные ландшафты (степь, полупустыня) Восточного Кавказа и южной границы Русской равнины (Ростовский заповедник) (Gudova et al., 2021; Amshokova et al., 2024). Нами вид был зарегистрирован в Тляратинском заказнике на высоте 1800 м над ур.м., где симпатрично и симбиотопично обитал с *A. uralensis*, заселял разнообразные биотопы: каменистые склоны с разнотравно-клеверным сообществом и участками дуба с разреженной травянистой растительностью, злаково-разнотравные биотопы, опушки и поляны березового леса (Amshokova et al., 2024; Гудова и др., 2026).

## Заключение

Изучены видовой состав и генетическое разнообразие представителей рода *Apodemus* в степной зоне Центрального Предкавказья. На обозначенной территории выявлено обитание трех криптических видов: *A. uralensis*, *A. witherbyi* и *A. flavicollis* с дистанциями от 10 до 13 %. Для исследованной территории виды *A. flavicollis* и *A. witherbyi* описаны впервые на основании генетически датированного материала. *A. flavicollis* и *A. uralensis* регистрировались во всех четырех точках: окрестности сел Арик, Карагач, пос. Джулат и хут. Баксанский. *A. witherbyi* обнаружен в трех географических точках из четырех: окрестности сел Арик, Карагач, пос. Джулат.

Рассматривая общие особенности распространения, ландшафтно-биотопического распределения и численно-

сти представителей рода *Apodemus*, можно сделать вывод, что в условиях степной зоны Центрального Предкавказья малая лесная мышь, имеющая широкое распространение, наиболее тяготеет к лесным массивам, достигая здесь максимального обилия, реже – к лесозащитным полосам. Вид также многочислен на береговых фитоценозах оросительных каналов, избегает наиболее ксерофитных луговых стадий – целинных неудобий, прилегающих к агроценозу. С малой лесной мышью симбиотопически обитает желтогорлая мышь, которая тоже приурочена к лесу и лесозащитным полосам, регистрируется и на увлажненных местах – берегах каналов; нет ее на степных открытых участках, склонах – неудобьях. Условия обитания малой лесной и желтогорлой мышей наиболее сходны. *A. witherbyi* демонстрирует более узкий ареал по сравнению с другими двумя видами, предпочитая открытые стаии, луговые участки, берега оросительных каналов, целинные земли – неудобья, где этот вид обычен, вместе с тем максимальных значений численности достигает в лесозащитных полосах.

*A. uralensis* чаще всего доминирует в лесу, а относительно года и сезона исследования *A. flavicollis* выступает содоминантом, иногда здесь отмечается смена доминанта и преобладает второй вид. *A. witherbyi*, как правило, является абсолютным доминантом, реже содоминантом с малой лесной мышью на лугу, целинных необрабатываемых участках, в единичных случаях выступает монодоминантом или содоминантом с желтогорлой мышью в лесополосах и на берегах оросительных каналов.

На территорию Центрального Предкавказья в геологическое время первым проник *A. uralensis* с Русской равнины и, вероятно, в два этапа. Первый – примерно 370–350 тыс. лет назад, второй – около 256 тыс. лет назад, что, согласно последней версии стратиграфической шкалы РФ (2024), соответствует середине неоплейстоцена. Этот период приходится на оптимум лихвинского межледникового. Полученные данные по генетическому разнообразию *A. uralensis* позволяют считать, что обмен генами с особями европейской части России активно продолжается.

*A. witherbyi* на Центральное Предкавказье попал, возможно, тоже двумя этапами: в позднем неоплейстоцене, примерно 166–154 тыс. лет назад, и в раннем голоцене, примерно 125–115 тыс. лет назад. О происхождении вида на Кавказе пока преждевременно судить в связи с недостаточностью материала из других регионов.

*A. flavicollis* – самый молодой вселенец на Центральном Предкавказье. Его эволюционный возраст составляет примерно 100 тыс. лет, вид в регионе является представителем голоценовой фауны. Изменчивость мтДНК свидетельствует о близком родстве с представителями Малой Азии, что дает основание полагать, что на Кавказ мышь проникла через Черноморское побережье из Малой Азии.

## Список литературы / References

Богданов А.С., Стахеев В.В., Зыков А.Е., Якименко В.В., Малькова М.Г. Анализ генетической изменчивости и дифференциации лесных мышей рода *Sylviaemus* по результатам секвенирования фрагмента гена первой субъединицы цитохромоксидазы. *Генетика*. 2012;48(2):211–224

- [Bogdanov A.S., Stakheev V.V., Zykov A.E., Yakimenko V.V., Mal'kova M.G. Genetic variation and differentiation of wood mice from the genus *Sylvaemus* inferred from sequencing of the cytochrome oxidase subunit 1 gene fragment. *Russ J Genet.* 2012;48(2): 186-198. doi 10.1134/S1022795412020044]
- Верещагин Н.К. Млекопитающие Кавказа. История формирования фауны. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1959
- [Vereshchagin N.K. The Mammals of the Caucasus. A History of the Evolution of the Fauna. Moscow; Leningrad, 1959 (in Russian)]
- Воронцов Н.Н., Боевский Г.Г., Межжерин С.В., Ляпунова Е.А., Кандауров А.С. Систематика лесных мышей *Sylvaemus* Кавказа (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*). *Зоологический журнал.* 1992;71(3):119-131
- [Vorontsov N.N., Boyeskorov G.G., Mezherin S.V., Lyapunova E.A., Kandaurov A.S. Systematics of the Caucasian wood mice of the subgenus *Sylvaemus* (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*). *Zoologicheskii Zhurnal.* 1992;71(3):119-131 (in Russian)]
- Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб., 1995
- [Gromov I.M., Erbaeva M.A. Mammals of the Fauna of Russia and Adjacent Territories. Hares and Rodents. St. Petersburg, 1995 (in Russian)]
- Гудова М.С., Амшкова А.Х., Боттаева З.Х. Новые данные по видовому разнообразию и структуре сообществ мелких млекопитающих Тляратинского заказника государственного природного заповедника «Дагестанский». *Амурский зоологический журнал.* 2026;18(1):190-206. doi 10.33910/2686-9519-2026-18-1-190-206
- [Gudova M.S., Amshokova A.Kh., Bottaeva Z.Kh. Current state of species diversity and community structure of small mammals in the Tlyaratinsky Wildlife Sanctuary of the Dagestansky State Nature Reserve. *Amurian Zoological Journal.* 2026;18(1):190-206. doi 10.33910/2686-9519-2026-18-1-190-206 (in Russian)]
- Загороднюк Н.В., Боевский Г.Г., Зыков А.Е. Изменчивость и таксономический статус степных форм мышей рода *Sylvaemus* (*falzeini* – *fulvipectus* – *hermonensis* – *arianus*). *Вестник зоологии.* 1997;31(5-6):37-56
- [Zagorodniuk N.V., Boeskorov G.G., Zykov A.E. Variability and taxonomic status of steppe forms of mice of the genus *Sylvaemus* (*falzeini* – *fulvipectus* – *hermonensis* – *arianus*). *Vestnik Zoologii.* 1997;31(5-6):37-56 (in Russian)]
- Лашкова Е.И., Дзеверин И.И. Возможная роль межвидовой конкуренции в формировании ареалов лесных мышей *Sylvaemus* (Rodentia, Muridae). *Вестник зоологии.* 2004;38(6):41-46
- [Lashkova E.I., Dzeverin I.I. The possible role of interspecific competition in the formation of specific geographic ranges in wood mice *Sylvaemus* (Rodentia, Muridae). *Vestnik Zoologii.* 2004;38(6):41-46 (in Russian)]
- Маркова А.К. Фауны мелких млекопитающих Европы первой половины среднего плейстоцена. *Известия РАН. Сер. географическая.* 2016;1:87-102. doi 10.15356/0373-2444-2016-1-87-102
- [Markova A.K. Faunas of small mammals of the first half of the Middle Pleistocene in Europe. *Izvestiya Rossiiskoy Akademii Nauk. Seriya Geograficheskaya* = *Bulletin of the RAS. Geographical series.* 2016;1:87-102. doi 10.15356/0373-2444-2016-1-87-102 (in Russian)]
- Маркова А.К. Европейские фауны мелких млекопитающих второй половины среднего плейстоцена: видовой состав, распространение, корреляции. *Бюллетень Комиссии по изучению четвертичного периода.* 2017;75:11-33
- [Markova A.K. European faunas of small mammals in the second half of the Mid-Pleistocene: species spectra, spatial distribution, correlation. *Byulleten' Komissii po Izucheniyu Chetvertichnogo Perioda* = *Bulletin of Comission for Study of Quaternary.* 2017;75: 11-33 (in Russian)]
- Млекопитающие фауны СССР. М.; Л.: Наука, 1963
- [Mammalian Fauna of the USSR. Moscow; Leningrad: Nauka Publ., 1963 (in Russian)]
- Окулова Н.М., Рябова Т.Е., Василенко Л.Е., Юничева Ю.В. Биотопическое размещение мелких млекопитающих в горах и предгорьях Краснодарского края и Республики Адыгея. В: Млекопитающие горных территорий: Материалы международной конференции. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2007;234-239
- [Okulova N.M., Ryabova T.E., Vasilenko L.E., Yunicheva Yu.V. Biotopic distribution of small mammals in mountains and foothills of Krasnodar region and Republic of Adygea. In: Mammals of Mountainous Territories: Proceedings of the international conference. Moscow, 2007;234-239 (in Russian)]
- Павлинов И.Я. Краткий определитель наземных зверей России. М.: Изд-во МГУ, 2002
- [Pavlinov I.Ya. Brief Guide to Land Animals of Russia. Moscow: Moscow State University Press, 2002 (in Russian)]
- Павлинов И.Я., Лисовский А.А. Млекопитающие России: систематико-географический справочник. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2012
- [Pavlinov I.Ya., Lisovsky A.A. The Mammals of Russia: a taxonomic and geographic reference. Moscow, 2012 (in Russian)]
- Полякова Т.А. Адаптивные стратегии и генетическая устойчивость видов рода *Spiraea* (Rosaceae) в природных популяционных системах. *Успехи современной биологии.* 2022;142(5):530-542. doi 10.31857/S0042132422050118
- [Poliakova T.A. Adaptive strategies and genetic stability of species of the genus *Spiraea* (Rosaceae) in natural population systems. *Uspekhi Sovremennoi Biologii* = *Advances in Current Biology.* 2022; 142(5):530-542. doi 10.31857/S0042132422050118 (in Russian)]
- Попов В.А. Млекопитающие Волжско-Камского края: насекомые, рукокрылые, грызуны. Казань, 1960
- [Popov V.A. Mammals of the Volga-Kama Region: Insects, Bats, Rodents. Kazan, 1960 (in Russian)]
- Пушкин С.В. Редкие и исчезающие виды насекомых Центрального Предкавказья: насекомые. М.; Берлин: Директ-Медиа, 2015
- [Pushkin S.V. Rare and Endangered Species of Insects of the Central Ciscaucasia: Insects. Moscow; Berlin: Direct-Media Publ., 2015 (in Russian)]
- Свиточ А.А., Соболев В.М. Плейстоценовые проливы Маныча (морфология, строение и развитие). *Вестник Московского университета. Сер. 5. География.* 2011;4:70-77
- [Svitch A.A., Sobolev V.M. Pleistocene straits of the Manych river: morphology, structure and evolution. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria 5. Geografiya* = *Moscow University Bulletin. Series 5. Geography.* 2011;4:70-77 (in Russian)]
- Сигида Р.С. Адаптации жуков жужелиц к эдафическим факторам в условиях антропогенных ландшафтов Центрального Предкавказья: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Астрахань, 2010
- [Sigida R.S. Adaptations of Ground Beetles to Edaphic Factors under the Conditions of Anthropogenic Landscapes of Central Ciscaucasia. Extended Abstract of Dr. Biol. Sci. Diss. Astrakhan, 2010 (in Russian)]
- Стахеев В.В. Роль исторических и экологических факторов в формировании фауны и динамике населения насекомоядных и грызунов равнин юга европейской части России: Дис. ... д-ра биол. наук. Ростов н/Д, 2024
- [Stakheev V.V. The Role of Historical and Ecological Factors in the Formation of the Fauna and Population Dynamics of Insectivores and Rodents in the Plains of Southern European Russia. Dr. Biol. Sci. Diss. Rostov-on-Don, 2024 (in Russian)]
- Сухих Н.М. Молекулярно-генетические и морфологические исследования криптических видов *Copepoda* континентальных вод России и сопредельных территорий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2013
- [Sukhikh N.M. Molecular and Morphological Studies of Cryptic Species of *Copepoda* in Continental Waters of Russia and Adjacent Territories. Extended Abstract of Cand. Biol. Sci. Diss. St. Petersburg, 2013 (in Russian)]
- Татаринев К.А. Фауна хребетных заходу Украины. Львов: Изд-во Львовского ун-та, 1973
- [Tatarinov K.A. Fauna of the Ridges of Ukraine. Lviv: Lviv University Publ., 1973 (in Russian)]
- Темботов А.К. География млекопитающих Северного Кавказа. Нальчик: Эльбрус, 1972

- [Tembotov A.K. Geography of Mammals of the North Caucasus. Nalchik: Elbrus Publ., 1972 (in Russian)]
- Темботова Ф.А. Млекопитающие Кавказа и омывающих его морей. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2005
- [Tembotova F.A. Mammals of the Caucasus and the Surrounding Seas. Moscow, 2005 (in Russian)]
- Тесаков А.С. Эволюция фаун мелких млекопитающих и континентальная биостратиграфия позднего кайнозоя юга Восточной Европы и Западной Азии: Дис. ... д-ра геол.-мин. наук. М., 2021
- [Tesakov A.S. Evolution of Small Mammal Faunas and Continental Biostratigraphy of the Late Cenozoic in Southern Eastern Europe and Western Asia. Dr. Geol.-Miner. Sci. Diss. Moscow, 2021 (in Russian)]
- Челомина Г.Н., Атопкин Д.М. Молекулярно-генетические свидетельства глубокого филогенетического разрыва между европейской и азиатской расами малой лесной мыши по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК. *Молекулярная биология*. 2010; 44(5):792-803
- [Chelomina G.N., Atopkin D.M., Molecular genetic evidences of a deep phylogenetic discontinuity between the Asian and European races of pygmy wood mouse based on the mitochondrial cytochrome *b* gene variability. *Mol. Biol.* 2010;44(5):699-708. doi 10.1134/S0026893310050043]
- Челомина Г.Н., Сузуки Х. Молекулярная эволюция и филогеография западнопалеарктических лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным о вариативности генов ядерной (*IRBP*) и митохондриальной (цитохром *b*) ДНК. *Зоологический журнал*. 2006;85(2): 219-234
- [Chelomina G.N., Suzuki H. Molecular evolution and phylogeography of west-Palaearctic wood mice of the genus *Sylvaemus* based on the data on variation of nuclear (*IRBP*) and mitochondrial (*cyt b*) DNA genes. *Zoologicheskij Zhurnal*. 2006;85(2):219-234 (in Russian)]
- Челомина Г.Н., Атопкин Д.М., Богданов А.С. Филогенетические связи видов и внутривидовых форм лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным частичного секвенирования гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК. *Доклады Академии наук*. 2007;416(2): 282-285
- [Chelomina G.N., Atopkin D.M., Bogdanov A.S. Phylogenetic relationships between species and intraspecific forms of forest mice from the genus *Sylvaemus* as determined by partial sequencing of the cytochrome *b* gene of mitochondrial DNA. *Dokl Biol Sci.* 2007;416: 356-359. doi 10.1134/S0012496607050092]
- Amir Afzali Y., López-Antoñanzas R. Molecular phylogeny and historical biogeography of Iranian murids (Rodentia: Muridae). *Mamm Biol.* 2024;104:79-89. doi 10.1007/s42991-023-00390-3
- Amshokova A.Kh., Tembotova F.A., Kononenko E.P., Gudova M.S. Molecular genetic analysis of representatives of the subgenus *Sylvaemus* (Rodentia, Muridae) in specially guarding natural areas in the southern of Russia according to data analysis of a fragment of the cytochrome *b* gene. *Biol Bull Russ Acad Sci.* 2024;51(Suppl.2): 127-148. doi 10.1134/S1062359024611649
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16(1):37-48. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Darvish J., Mohammadi Z., Ghorbani F., Mahmoudi A., Dubey S. Phylogenetic relationships of *Apodemus* Kaup, 1829 (Rodentia: Muridae) species in the Eastern Mediterranean inferred from mitochondrial DNA, with emphasis on Iranian species. *J Mamm Evol.* 2015; 22(4):583-595. doi 10.1007/s10914-015-9294-9
- Excoffier L., Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(3):564-567. doi 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fu Y. New statistical test of neutrality for DNA sample from a population. *Genetics*. 1996;143(1):557-570. doi 10.1093/genetics/143.1.557
- Gudova M.S., Tembotova F.A., Emkuzheva M., Amshokova A.Kh., Kuchinova E.A. Current diversity of small mammals of the “Sarykum Barkhans” of Dagestan Reserve. *BIO Web Conf.* 2021;35: 00010. doi 10.1051/bioconf/20213500010
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16(2):111-120. doi 10.1007/BF01731581
- Michaux J.R., Libois R., Filippucci M.G. Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the near and Middle East. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;32(3):788-798. doi 10.1016/j.ympev.2004.02.018
- Radespiel U., Bruford M.W. Fragmentation genetics of rainforest animals: insights from recent studies. *Conserv Genet.* 2014;15:245-260. doi 10.1007/s10592-013-0550-3
- Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol.* 2018;67(5):901-904. doi 10.1093/sysbio/syy032
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(12):1572-1574. doi 10.1093/bioinformatics/btg180
- Shad H.H., Darvish J., Pouyani E.R. Genetic variation in populations of field mouse *Apodemus witherbyi* (Thomas, 1902) (Rodentia: Muridae) in Iran inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences and geometric morphometrics. *Acta Zool Bulg.* 2016;68(3): 311-320
- Soulé M.E., Simberloff D. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? *Biol Conserv.* 1986;35(1):9-40. doi 10.1016/0006-3207(86)90025-X
- Stakheev V.V., Bogdanov A.S., Vodolazhskii D.I. Revision of the species composition of the wood mice from the genus *Sylvaemus* from the territory of Rostov oblast using karyological, allozyme and molecular genetic analysis. *Russ J Genet.* 2011;47(5):579-589. doi 10.1134/S1022795411050152
- Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 2018;4(1):vey016. doi 10.1093/ve/vey016
- Suzuki Y., Tomozawa M., Koizumi Y., Tsuchiya K., Suzuki H. Estimating the molecular evolutionary rates of mitochondrial genes referring to Quaternary ice age events with inferred population expansions and dispersals in Japanese *Apodemus*. *BMC Evol Biol.* 2015;15:187. doi 10.1186/s12862-015-0463-5
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):585-595. doi 10.1093/genetics/123.3.585
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729. doi 10.1093/molbev/mst197
- Wang W., Qiao Y., Li S., Pan W., Yao M. Low genetic diversity and strong population structure shaped by anthropogenic habitat fragmentation in a critically endangered primate, *Trachypithecus leucocephalus*. *Heredity*. 2017;118(6):542-553. doi 10.1038/hdy.2017.2
- Yalkovskaya L., Sibiryakov P., Borodin A. Phylogeography of the striped field mouse (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771) in light of new data from central part of Northern Eurasia. *PLoS One*. 2022;17(10): e0276466. doi 10.1371/journal.pone.0276466
- Yasuda S.P., Vogel P., Tsuchiya K., Han S.-H., Lin L.-K., Suzuki H. Phylogeographic patterning of mtDNA in the widely distributed harvest mouse (*Micromys minutus*) suggests dramatic cycles of range contraction and expansion during the mid-to-late Pleistocene. *Can J Zool.* 2005;83(11):1411-1420. doi 10.1139/z05-139



doi 10.18699/vjgb-26-94

## Особенности метилирования ДНК в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела

И.А. Гончарова , А.А. Зарубин , А.В. Марков , С.А. Шипулина , Н.П. Бабушкина , Ю.А. Королёва ,  
А.А. Слепцов , М.С. Назаренко 

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра  
Российской академии наук, Томск, Россия

 irina.goncharova@medgenetics.ru

**Аннотация.** Дилатация/аневризма и расслоение восходящей аорты относятся к жизнеугрожающим заболеваниям, и выявление эпигенетического ландшафта, регулирующего функционирование генома в клетках аорты при данной патологии, является актуальной задачей. В связи с этим в настоящем исследовании выполнена идентификация дифференциально метилированных генов (ДМГ) в тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела с помощью реанализа данных по метилированию ДНК, представленных в открытом доступе в репозитории NCBI GEO (Gene Expression Omnibus). Проведен реанализ результатов исследований (GSE50192, GSE202047, GSE84274), реализованных на платформе Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. Биоинформатическая деконволюция клеточного состава тканей сосудов осуществлена с помощью алгоритма HEPiDISH, а также разработанного референса, включавшего набор CpG-сайтов, индекс метилирования которых специфичен для эндотелиальных клеток, фибробластов, гладкомышечных и иммунных клеток. Реанализ данных показал, что расслоение аорты и ее дилатация/аневризма с двухстворчатым аортальным клапаном характеризуются специфическим профилем метилирования ДНК относительно интактной ткани аорты, поскольку различаются как по числу, так и по спектру ДМГ. Поправка на клеточный состав аннулирует основное количество ДМГ, но позволяет составить представление о наличии воспаления в ткани аорты, оцениваемого по степени инфильтрации ткани иммунными клетками, охарактеризовать роль воспалительного инфильтрата в нарушении целостности стенки аорты и выявить гены, отражающие различия, связанные с изучаемыми фенотипами, а не с межгрупповой гетерогенностью клеточных популяций. Гены *NFIX*, *PCDH7*, *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1*, *NKD1*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *ARAP2*, *TBX3*, *TBX5*, оставшиеся в статусе ДМГ после поправки на клеточный состав и экспрессируемые в отдельных клетках/цельной ткани аорты, могут рассматриваться как новые гены-кандидаты развития дилатации/аневризмы аорты у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном. Белковые продукты генов *NFIX*, *LMO4*, *DIP2C*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *MED13L*, *TBX3* и *TBX5* являются транскрипционными факторами или регуляторами транскрипционной активности ДНК, а гена *NKD1* – ингибитором сигнального пути Wnt. Полученные данные подчеркивают необходимость строгого подхода к формированию групп сравнения с полным описанием исследуемого фенотипа, включающим морфологию аортального клапана, и проведения исследований на уровне отдельных клеток.

**Ключевые слова:** дилатация/аневризма восходящей аорты; расслоение восходящей аорты; метилирование ДНК; HEPiDISH; поправка на клеточный состав

**Для цитирования:** Гончарова И.А., Зарубин А.А., Марков А.В., Шипулина С.А., Бабушкина Н.П., Королёва Ю.А., Слепцов А.А., Назаренко М.С. Особенности метилирования ДНК в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):938-948. doi 10.18699/vjgb-26-94

**Финансирование.** Работа выполнена при частичном финансировании госзадания Министерства науки и высшего образования РФ № 122020300041-7.

## DNA methylation analysis of aortic wall tissue in ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection

I.A. Goncharova , A.A. Zarubin , A.V. Markov , S.A. Shipulina , N.P. Babushkina , Iu.A. Koroleva ,  
A.A. Sleptcov , M.S. Nazarenko 

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

 irina.goncharova@medgenetics.ru

**Abstract.** Ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection are life-threatening cardiovascular conditions. However, the epigenetic regulatory mechanisms within aortic cells underlying these pathologies remain poorly understood. This study aimed to identify differentially methylated genes (DMGs) in aortic tissues from patients with ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection by performing a re-analysis of publicly available DNA methylation datasets. A re-analysis was conducted on three DNA methylation datasets (GSE50192, GSE202047, GSE84274) from the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. To account for tissue heterogeneity, cellular deconvolution was performed using the HEPiDISH algorithm and a custom reference panel of cell-type-specific CpG sites for key vascular cell types (endothelial cells,

fibroblasts, smooth muscle cells, immune cells). Our re-analysis revealed that aortic dissection and bicuspid aortic valve patients with aortic dilatation/aneurysm exhibit distinct DNA methylation profiles compared to intact aorta. These pathologies differ from each other in the number and the spectrum of DMGs. The adjustment for cellular heterogeneity eliminated the majority of the initially identified DMGs. However, this correction helped to make an assessment of vascular inflammation, characterize its impact on aortic wall stability, and identify genes with differential DNA methylation associated with the disease phenotypes, rather than with inter-group heterogeneity. The genes *NFIX*, *PCDH7*, *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1*, *NKD1*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *ARAP2*, *TBX3*, and *TBX5*, which remained in the DMG status after adjustment for cellular composition and are expressed in individual cells/whole aortic tissue, can be considered as new candidate genes for the development of aortic dilatation/aneurysm in patients with bicuspid aortic valve. *NFIX*, *LMO4*, *DIP2C*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *MED13L*, *TBX3*, *TBX5* are transcriptional regulators or modulators; *NKD1* is a recognized inhibitor of the Wnt pathway. Our findings highlight the necessity of a rigorous approach to cohort design, which includes comprehensive phenotyping (encompassing aortic valve morphology) and underscore the importance of future single-cell investigations.

**Key words:** ascending aortic dilatation/aneurysm; ascending aortic dissection; DNA methylation; HEpiDISH; cell-type adjustment

**For citation:** Goncharova I.A., Zarubin A.A., Markov A.V., Shipulina S.A., Babushkina N.P., Koroleva Iu.A., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S. DNA methylation analysis of aortic wall tissue in ascending aortic dilatation/aneurysm and dissection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(6):938-948. doi 10.18699/vjgb-26-94

## Введение

Метилирование ДНК – один из основных механизмов эпигенетических модификаций генома как в норме, так и при патологии. Тем не менее исследования метилирования ДНК в пораженных тканях при дилатации/аневризме и расслоении восходящей аорты немногочисленны (Shah et al., 2015; Pan et al., 2017; Björck et al., 2018; Li N. et al., 2020; Liu et al., 2021; Chen Y. et al., 2022; Гончарова и др., 2024; Королева и др., 2024). Полученные в этих работах данные в малой степени пересекаются, что связано с гетерогенными по фенотипу группами больных, разными тканями (фрагменты различных отделов аорты, периферическая кровь), использованными в исследованиях, и методами оценки метилирования ДНК. Однако анализ результатов данных работ позволяет сделать некоторые заключения, в том числе: дифференциально метилированные между пораженной и интактной тканью аорты регионы обогащены генами, участвующими в развитии сердечно-сосудистой системы; в патогенезе аневризмы аорты участвуют сигнальные пути MAPK, WNT, TGF $\beta$ , HOX; строение аортального клапана является одним из факторов, определяющих патогенетические механизмы развития дилатации/аневризмы восходящей аорты.

Хорошо известно, что клеточная гетерогенность оказывает влияние на результаты исследований метилирования ДНК. Стенки кровеносных сосудов содержат разное количество нескольких типов клеток, составляющих их слоистую структуру, и иммунных клеток. Все эти клетки демонстрируют различные паттерны метилирования ДНК. Следовательно, изменения в паттернах метилирования ДНК могут указывать на изменения в клеточном составе, а не предоставлять достоверную информацию об aberrантном метилировании ДНК. В нашей работе мы учитываем клеточный состав артерий как переменную, которая влияет на уровень метилирования ДНК.

В связи с этим целью настоящего исследования была идентификация дифференциально метилированных генов в пораженных тканях аорты при дилатации/аневризме и расслоении восходящего отдела с учетом поправки на их клеточный состав посредством интеграции и реанализа данных по метилированию ДНК патологически изменен-

ных и контрольных тканей восходящего отдела аорты, представленных в открытом доступе в репозитории NCBI Gene Expression Omnibus (GEO).

## Материалы и методы

Проведен реанализ результатов исследований, представленных под идентификационными номерами GSE50192, GSE202047 и GSE84274, выполненных на платформе Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip.

Описание исследований GSE50192, GSE202047, GSE84274, на основании которых выполнен реанализ, представлено в табл. 1. Образцы, проанализированные в GSE50192, являются аутопсийным материалом семнадцати соматических тканей четырех человек: трое мужчин, двое из которых умерли от инфаркта миокарда в возрасте 40 и 53 лет и один от геморрагического инсульта в 54 года; женщина, умершая от геморрагического инсульта в 60 лет. Для дальнейшего анализа нами были выбраны данные по метилированию ДНК в образцах коронарных артерий, восходящего и брюшного отделов аорты.

Образцы, описанные в GSE202047, представляют собой ткани восходящей аорты пациентов с расслоением типа А по Стэнфорду (РВА) ( $n = 4$ ) и здоровых доноров органов ( $n = 4$ ), далее по тексту – интактная восходящая аорта (ИВА). Пациенты и здоровые доноры являются мужчинами (средний возраст  $49.10 \pm 4.91$  и  $47.92 \pm 6.73$  года соответственно).

В GSE84274 нами проанализированы образцы ткани восходящей аорты: у пациентов с острым расслоением типа А по Стэнфорду с аортальным клапаном нормального строения ( $n = 12$ ; 10 мужчин (52.4 года), 2 женщины); с дилатацией/аневризмой аорты ( $d > 4.5$  см) и двухстворчатым аортальным клапаном (АВА с ДАК) ( $n = 6$ ; 5 мужчин (53.8 года), 1 женщина); здоровых доноров органов (ИВА) ( $n = 6$ ; все мужчины, 36.7 года).

Статистический анализ осуществлен с помощью пакетов *lumi*, *limma* в программной среде R (Bioconductor). Для снижения размерности данных применяли метод главных компонент (PCA). Коррекция ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) при множественных сравнениях выполнена по методу Benjamini–Hochberg.

**Таблица 1.** Характеристика исследований, привлеченных к реанализу данных по метилированию ДНК тканей восходящей, брюшной аорты, коронарных артерий и патологически измененных тканей восходящего отдела аорты

| Идентификатор в базе данных GEO DataSets | Характеристика биообразцов                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Основные результаты                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Литературный источник |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| GSE50192                                 | <i>n</i> = 4, 17 аутопсийных тканей, в том числе парные ткани коронарных артерий, восходящей и брюшной аорты                                                                                                                                                                                                                 | Аорта и коронарные артерии группируются в общий кластер по профилю метилирования ДНК и обладают наибольшим числом тканеспецифичных дифференциально метилированных регионов в области генов, обеспечивающих процессы развития сосудов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Lokk et al., 2014     |
| GSE202047                                | <i>n</i> = 4, ткань восходящей аорты пациентов с расслоением типа А по Стэнфорду;<br><i>n</i> = 4, ткань восходящей аорты здоровых доноров органов                                                                                                                                                                           | Обнаружено 589 дифференциально метилированных сайтов ( <i>P</i> -value ≤ 0.05,   $\beta$ difference ( $\Delta\beta$ )  ≥ 0.3) генов сигнальных путей MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), TNF (факторы некроза опухолей), апоптоза, ангиогенеза, развития сердца и др. Ключевыми являются гены <i>FAS</i> , <i>ANGPT2</i> , <i>DUSP6</i> , <i>FARP1</i> , <i>CARD6</i>                                                                                                                                                                            | Chen Y. et al., 2022  |
| GSE84274                                 | <i>n</i> = 12, ткань восходящей аорты с острым расслоением типа А по Стэнфорду с аортальным клапаном нормального строения;<br><i>n</i> = 6, ткань восходящей аорты с дилатацией/аневризмой ( <i>d</i> > 4.5 см) и двухстворчатым аортальным клапаном (ДАК);<br><i>n</i> = 6, ткань восходящей аорты здоровых доноров органов | Расслоение с аортальным клапаном нормального строения и дилатация/аневризма восходящей аорты с ДАК характеризуются потерей метилирования ДНК в сайтах, отличных от CpG, и различными профилями метилирования ДНК в CpG-сайтах. При дилатации/аневризме аорты с ДАК в основном гиперметилированы мишени EZH2 (гистон-лизин-N-метилтрансфераза EZH2). Расслоение аорты характеризуется дедифференцировкой гладкомышечных клеток, а также повышенной экспрессией гена <i>RARA</i> (альфа-рецептора ретиноевой кислоты), связанной с гипометилированием ДНК | Pan et al., 2017      |

В качестве параметра уровня метилирования ДНК использован индекс метилирования  $\beta$ .

Дифференциально метилированными считались CpG-сайты (ДМС) с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов  $FDR < 0.05$  и  $|\Delta\beta| \geq 0.2$ . Гены, содержащие ДМС, определялись как дифференциально метилированные гены (ДМГ). Подробно охарактеризованы первые двадцать сайтов с максимальными различиями в уровне метилирования ДНК между сравниваемыми тканями, определяемыми по значению  $|\Delta\beta|$ .

Идентификация ДМС при патологии восходящей аорты с учетом поправки на клеточный состав проводилась с помощью алгоритма деконволюции профилей метилирования ДНК HEpiDISH (Hierarchical Epigenetic Dissection of Intra-Sample-Heterogeneity; Zheng et al., 2019), а также разработанного нами референса, включающего набор CpG-сайтов, метилирование которых специфично для эндотелиальных клеток (данные GSE84395, GSE122126, GSE82234, GSE40699 из репозитория GEO), фибробластов (GSE40699), гладкомышечных клеток (ГМК) (GSE40699, GSE113061), иммунных клеток (GSE35069), а также данные ENCSR420WUN из проекта ENCODE (Марков и др., 2020).

Функциональная аннотация выявленных ДМГ проведена с привлечением базы данных по экспрессии генов в тканях дуги аорты (GTEx Portal; <https://gtexportal.org>), результатов транскриптомных исследований отдельных клеток при аневризме восходящей аорты (PlaqView; <https://plaqviewv2.pods.uvarc.io>), данных по экспрессии генов при аневризме восходящей аорты, представленных в открытом доступе в базе Gene Expression Omnibus (GSE83675, GSE61128, GSE5180) и научной литературе (Kim et al., 2010; Doppler et al., 2023; Huang M. et al., 2023).

Выполнен сравнительный анализ спектра ДМГ и генов, ассоциированных с ишемической болезнью сердца (ИБС), инфарктом миокарда (ИМ), двухстворчатым аортальным клапаном (ДАК) по результатам широкогеномных исследований (GWAS) в базе данных GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas>), а также генов наследственных и синдромальных форм аневризмы грудной аорты (Elbitar et al., 2021; Li Y. et al., 2021).

### Результаты

При анализе профилей метилирования CpG-сайтов в образцах аорты в интегрированном наборе данных выявлено, что аутопсийные образцы артерий (GSE50192) отчетливо дистанцируются от тканей артерий, собранных во время оперативного лечения (GSE202047 и GSE84274) (рис. 1).

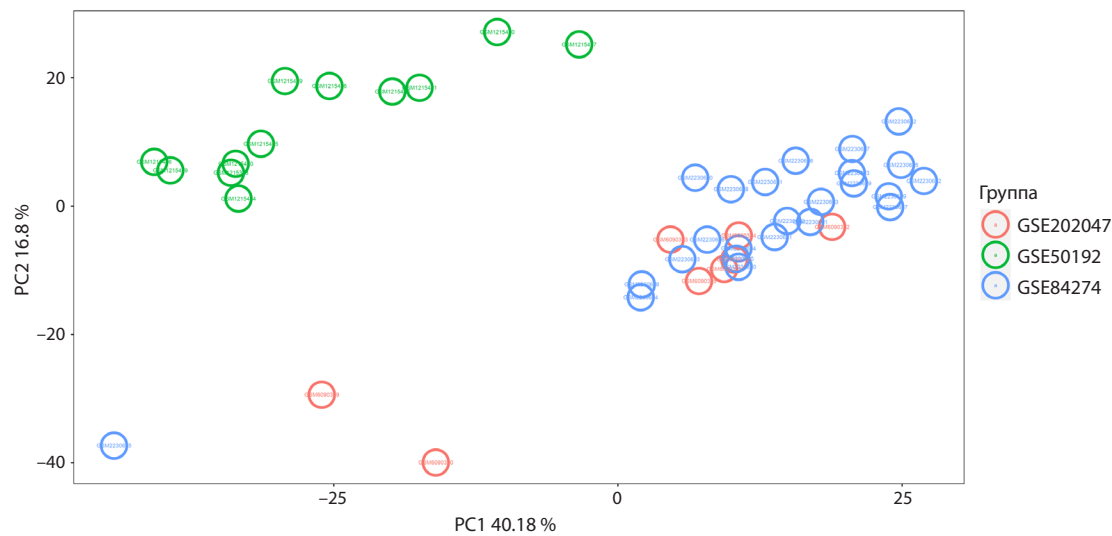
В связи с этим были объединены только данные GSE202047 и GSE84274 с включением всех образцов. Данные, полученные в работе GSE50192, в дальнейшем не анализировались.

### Идентификация дифференциально метилированных сайтов ДНК в тканях восходящей аорты с дилатацией/аневризмой и аномалией клапана, ее расслоением относительно интактной ткани аорты

При сравнительном анализе уровня метилирования ДНК между тканями АВА с ДАК и ИВА выявлено 57 ДМС (14 ДМГ). Среди всех ДМС 22 локализовано в CpG-берегах и 14 – в CpG-островках (табл. 2; лист «АВА с ДАК\_ИВА» в Приложении<sup>1</sup>). Большая часть ДМС (84.2 %) гиперметилирована в тканях АВА с ДАК относительно ИВА.

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:  
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx46.xlsx>





**Рис. 1.** Распределение анализируемых образцов в пространстве первых двух компонент в зависимости от уровня метилирования CpG-сайтов, представленных в исследованиях GSE50192, GSE202047 и GSE84274.

**Таблица 2.** Характеристика дифференциально метилированных CpG-сайтов/генов в сравниваемых группах

| Сравниваемые ткани                                                                          | Количество ДМС/ДМГ    | Локализация ДМС (a/b/c/d/f) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Дилатация/аневризма восходящей аорты с ДАК (n = 6)/<br>Интактная восходящая аорта (n = 10)  | Всего 57/14           | 8/0/14/22/4                 |
|                                                                                             | Гипер 48 (84.2 %)/10  | 7/0/12/21/2                 |
|                                                                                             | Гипо 9 (15.8 %)/4     | 1/0/2/1/2                   |
| Расслоение восходящей аорты (n = 16)/<br>Интактная восходящая аорта (n = 10)                | Всего 224/99          | 38/8/34/37/19               |
|                                                                                             | Гипер 110 (49.1 %)/41 | 16/4/23/14/4                |
|                                                                                             | Гипо 114 (50.9 %)/58  | 22/4/11/19/15               |
| Дилатация/аневризма восходящей аорты с ДАК (n = 6)/<br>Расслоение восходящей аорты (n = 16) | Всего 15/8            | 2/0/4/4/1                   |
|                                                                                             | Гипер 3 (20 %)/1      | 0/0/1/1/0                   |
|                                                                                             | Гипо 12 (80 %)/7      | 2/0/3/3/1                   |

Примечание. Локализация ДМС: а – промотор (TSS, 5'-UTR, 1-й экзон); b – 3'-UTR; c – CpG-островок; d – CpG-берег (shore), менее 2 т.п.н. от CpG-островка; f – CpG-шельф (shelf), 2–4 т.п.н. от CpG-островка.

В пределах нуклеотидной последовательности аннотированных генов обнаружено 23 CpG-сайта, восемь из которых локализованы в промоторах. Среди 23 CpG-сайтов, локализованных в пределах последовательностей известных генов, гипометилированными являются сайты генов *DIP2C* ( $\Delta\beta = -0.29$ ), *TMEM132C* ( $\Delta\beta = -0.29$ ,  $\Delta\beta = -0.25$ ), *CD82* ( $\Delta\beta = -0.23$ ), *ZFPM1* ( $\Delta\beta = -0.22$ ). CpG-сайт (cg01889574) *CD82* локализован в промоторе гена. Все эти гипометилированные ДМС/ДМГ, кроме *ZFPM1* (cg06099697), входят в первые 10 «топовых» сайтов с максимальными различиями в уровне метилирования ДНК между сравниваемыми тканями (см. лист «АВА с ДАК\_ИВА» Приложения).

Остальные ДМГ характеризуются наличием CpG-сайтов, гиперметилированных в тканях АВА с ДАК, где в генах *ISL1* и *KCNN2* идентифицировано по два, а в гене *TBX5* – шесть ДМС (см. лист «АВА с ДАК\_ИВА» Приложения). В число «топовых» CpG-сайтов с повышенным уровнем метилирования в пораженной ткани аорты входят: *ISL1* ( $\Delta\beta = 0.32$ ,  $\Delta\beta = 0.25$ ), *SNX25* ( $\Delta\beta = 0.31$ ), *TBX5*

( $\Delta\beta = 0.26$ ,  $\Delta\beta = 0.26$ ,  $\Delta\beta = 0.25$ ). Сайт cg12836958 и сайты cg23820885, cg09042277 локализованы в промоторах генов *SNX25* и *TBX5* соответственно (см. лист «АВА с ДАК\_ИВА» Приложения).

При сравнении уровня метилирования ДНК между тканями восходящей аорты с расслоением (РВА) относительно ИВА выявлено 224 ДМС (99 ДМГ). Из них 37 ДМС локализованы в CpG-берегах и 34 – в CpG-островках (см. табл. 2; лист «РВА\_ИВА» Приложения). В пределах нуклеотидной последовательности 99 генов установлено 130 CpG-сайтов, 38 из которых локализованы в промоторах. Около половины (49.1 %) ДМС в образцах РВА гиперметилированы. Среди «топовых» 10 CpG-сайтов к гиперметилированному относятся только сайты генов *ADARB2* ( $\Delta\beta = 0.37$ ,  $\Delta\beta = 0.35$ ) и *TTLL8* ( $\Delta\beta = 0.28$ ). В гене *ADARB2* определены два гипометилированных сайта – cg07162000 ( $\Delta\beta = -0.24$ ) и cg17861863 ( $\Delta\beta = -0.23$ ).

Из первых 10 CpG-сайтов в образцах РВА гипометилированы четыре сайта гена *TBX1*, расположенные в CpG-островке ( $\Delta\beta = -0.34...-0.29$ ), а также сайты генов

*FLJ42709 (NR2F1-AS1)* ( $\Delta\beta = -0.32$ ), *COL21A1* ( $\Delta\beta = -0.29$ ) и *MAP3K5* ( $\Delta\beta = -0.29$ ) (см. табл. 2; лист «РВА\_ИВА» Приложения).

Сравнение уровня метилирования ДНК между тканями АВА с ДАК и РВА показало наличие 15 ДМС (8 ДМГ). Четыре из всех ДМС локализованы в CpG-берегах и пять – в CpG-островках. В генах *CYP2W1* и *PLEKHF1* два CpG-сайта (cg09414673 и cg15561501 соответственно) расположены в промоторе (см. табл. 2; лист «АВА с ДАК и РВА» Приложения). Пятнадцать (80 %) всех ДМС гипометилированы в пораженных тканях аорты с аневризмой и ДАК относительно расслоения аорты (см. табл. 2; лист «АВА с ДАК и РВА» Приложения).

Среди CpG-сайтов, относящихся к известным генам, максимальными различиями в уровне метилирования между сравниваемыми тканями характеризуются гипометилированные в тканях аневризмы с ДАК сайты генов *DIP2C* ( $\Delta\beta = -0.27$ ) и *NFIX* ( $\Delta\beta = -0.27$ ,  $\Delta\beta = -0.24$ ). Два сайта, cg15561501 (*PLEKHF1*) и cg09414673 (*CYP2W1*), локализованные в промоторах генов, также гипометилированы в тканях аневризмы с ДАК ( $\Delta\beta = -0.21$  каждый из них, см. лист «АВА с ДАК и РВА» Приложения). ДМС гена *SLC1A3* гиперметилирован в пораженных тканях аорты при аневризме с ДАК ( $\Delta\beta = 0.21$ ).

### Реконструкция клеточного состава тканей восходящей аорты с дилатацией/аневризмой и аномалией клапана, ее расслоения и интактной ткани аорты

Поскольку клеточный состав тканей является значимым фактором для определения ДМС (Houseman et al., 2015, 2016), при анализе данных проводилась биоинформатическая деконволюция клеточного состава тканей аорты (рис. 2).

В результате использования алгоритма деконволюции профилей метилирования ДНК с предсказанием пропорций ожидаемых типов клеток в тканях восходящей аорты показано, что существенную долю клеток составляют ГМК (33.7–88.7 %) и лейкоцитарный компонент (6.7–51.3 %). ЭК сосудов представлены в меньшей степени (4.2–21.2 %), а фибробласты не выявляются алгоритмом. Из лейкоцитов существенную долю занимают моноциты (1.4–27.8 %).

Доля иммунных клеток в ИВА не превышает 15 % (в среднем 10.7 %), при АВА с ДАК этот показатель варьирует в диапазоне 6–16 % (в среднем 11.6 %), а при РВА степень инфильтрации сосудистой стенки иммунными клетками оценивается от 9 до 51 %, в среднем составляя 19.6 %, что значимо выше, чем в интактной аорте ( $p = 0.003$ ) (см. рис. 2).

### Идентификация ДМС и их генов при патологии восходящей аорты с учетом поправки на клеточный состав

После введения поправки на клеточный состав в списке CpG-сайтов, гипометилированных в образцах АВА с ДАК по сравнению с ИВА, остается сайт cg26561082 гена *DIP2C* ( $\Delta\beta = -0.29$ ), локализованный в области CpG-берега (табл. 3).



**Рис. 2.** Реконструкция клеточного состава тканей восходящей аорты в норме и при патологии с помощью алгоритма EpiDISH и разработанного референса метилома для клеток сосудов.

а – распределение клеточных типов в тканях восходящей аорты в исследуемых группах лиц (по вертикальной оси указан порядковый номер образца в каждой группе). ЭК – эндотелиальные клетки, ГМК – гладкомышечные клетки, В – В-лимфоциты, NK – NK-клетки, Т – Т-лимфоциты, Мон – моноциты, Нейт – нейтрофилы, Эоз – эозинофилы. б – доля иммунных клеток в исследуемых группах образцов по результатам оценки клеточного состава.

При сравнении уровней метилирования ДНК с поправкой на клеточный состав между группами РВА и ИВА значимых различий не обнаружено.

При сравнении уровня метилирования ДНК между АВА с ДАК и РВА после введения поправки на клеточный состав выявлено 12 ДМС, из которых два гиперметилированы, а десять гипометилированы в аорте при дилатации/аневризме (см. табл. 3). Семь дифференциально

**Таблица 3.** Дифференциально метилированные CpG-сайты между изученными группами после поправки на клеточный состав

| CpG-сайт, локализация<br>(GRCh37/hg19) | Локализация CpG-сайта<br>по отношению к ближайшему CpG-островку | Δβ ABA<br>с ДАК/ИВА | Δβ ABA<br>с ДАК/РВА | Ген                          |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| cg26561082, chr10:410363               | chr10:409201–409523/CpG-берег, нет                              | –0.29               | –0.27               | <i>DIP2C</i>                 |
| cg22824635, chr19:13112283             | chr19:13112170–13112809/CpG-островок, нет                       | –0.17               | –0.27               | <i>NFIX</i>                  |
| cg06744585, chr19:13135808             | chr19:13135317–13136169/CpG-островок, нет                       | –0.14               | –0.24               |                              |
| cg01393939, chr1:87803705              | chr1:87800835–87801252/CpG-шельф, нет                           | –0.18               | –0.23               | <i>LMO4</i>                  |
| cg10642548, chr10:77165750             | chr10:77155128–77169600/CpG-островок, нет                       | –0.23*              | –0.22               | <i>C10orf41 (ZNF503-AS2)</i> |
| cg06262069, chr10:76835911             | chr10:77155128–77169600/CpG-островок, нет                       | –0.21*              | –0.22               |                              |
| cg02015823, chr16:49142490             | chr16:50583175–50583465/CpG-берег, нет                          | –0.05               | –0.22               | <i>NKD1</i>                  |
| cg15561501, chr19:30160603             | chr19:30156038–30156795/CpG-шельф, 5' UTR                       | –0.07               | –0.21               | <i>PLEKHF1</i>               |
| cg09414673, chr7:1022797               | chr7:1024021–1024233/CpG-берег, TSS                             | –0.16               | –0.21               | <i>CYP2W1</i>                |
| cg02060919, chr4:32932085              | Нет                                                             | –0.072              | –0.24               | <i>PCDH7/ARAP2</i> межгенный |
| cg16945186, chr12:115103960            | chr12:115102687–115103982/CpG-островок, нет                     | 0.26                | 0.24                | <i>TBX5/TBX3</i> межгенный   |
| cg26343001, chr12:115104274            | chr12:115104848–115105548/CpG-берег, нет                        | 0.25                | 0.21                | <i>TBX3/MED13L</i> межгенный |

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения Δβ CpG-сайтов, соответствующих критериям ДМС (FDR < 0.05 и |Δβ| ≥ 0.2); \* Δβ CpG-сайтов с FDR > 0.05; TSS, 5' UTR – промотор.

метилированных генов (*LMO4*, *NFIX*, *CYP2W1*, *C10orf41 (ZNF503-AS2)*, *PLEKHF1*, *DIP2C*, *NKD1*) содержат гипометилированные CpG-сайты при аневризме восходящей аорты с ДАК относительно расслоения аорты (см. табл. 3).

Кроме того, три CpG-сайта располагались в межгенных регионах: cg02060919 (*PCDH7/ARAP2*) был гипометилирован в группе АВА с ДАК по сравнению с РВА, а сайты cg16945186 (*TBX5/TBX3*) и cg26343001 (*TBX3/MED13L*) были гиперметилированы при дилатации/аневризме восходящей аорты относительно расслоения аорты и интактной ткани аорты.

Таким образом, после введения поправки на клеточный состав показано, что АВА с ДАК относительно ИВА и РВА характеризуется снижением уровня метилирования большинства идентифицированных ДМГ, к которым относятся гены, кодирующие функционально активные молекулы, в том числе транскрипционные факторы (гены *DIP2C*, *LMO4*, *NFIX*, lncRNA *C10orf41 (ZNF503-AS2)*), ингибитор сигнального пути Wnt (*NKD1*), а также гены, белковые продукты которых обеспечивают апоптоз и аутофагию (*PLEKHF1*), фокальную адгезию и межклеточные взаимодействия (*PCDH7*, *ARAP2*) или относятся к семейству цитохромов P450 (*CYP2W1*).

Повышенным уровнем метилирования характеризуются межгенные CpG-сайты, вероятно, оказывающие влияние на функциональную активность генов транскрипционных факторов *TBX3* и *TBX5*, а также гена *MED13L*, белковый продукт которого относится к семейству комплекса медиаторов (MED), которые играют ключевую роль в транскрипции многочисленных генов эукариот.

#### Функциональная аннотация ДМГ с использованием баз данных и опубликованных исследований

Анализ экспрессии выявленных после поправки на клеточный состав ДМГ в тканях дуги аорты по данным GTEx Portal показал, что среди вышеперечисленных генов

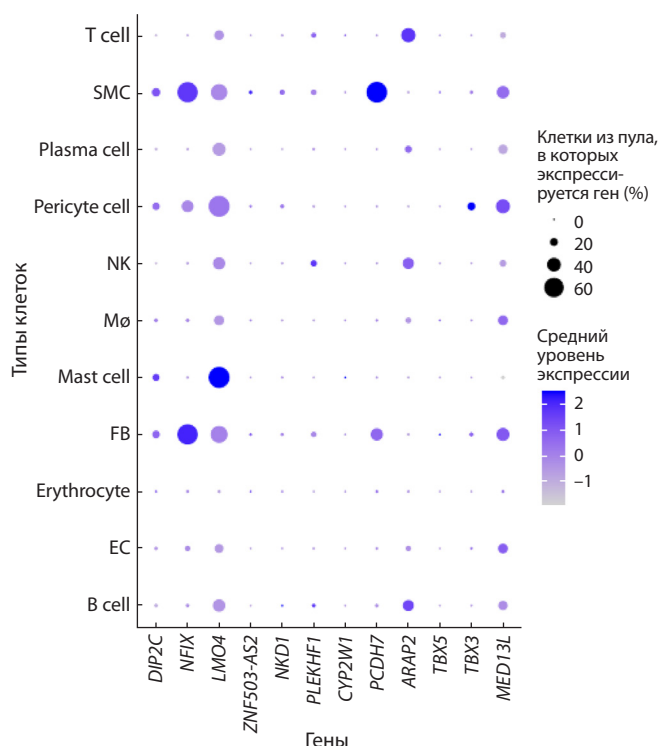
максимальным уровнем экспрессии характеризуются *NFIX* (131.7 TPM – транскриптов на миллион) и *PCDH7* (65.4 TPM). Гены *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1* и *NKD1* экспрессируются на среднем уровне (32.3, 29.6, 28.9, 27.1 и 16.5 TPM соответственно), а *C10orf41 (ZNF503-AS2)*, *TBX3*, *ARAP2*, *TBX5* и *CYP2W1* в дуге аорты почти не экспрессируются (0.06–3.90 TPM).

Привлечение результатов по экспрессии генов при аневризме восходящей аорты у больных с ДАК и ТАК, представленных в открытых источниках (GSE5180, GSE83675, GSE61128 из репозитория GEO) и научных публикациях (Kim et al., 2010; Doppler et al., 2023), позволило сделать вывод, что ДМГ, обнаруженные в настоящем исследовании, значимо не изменяют свою функциональную активность в пораженной аорте относительно интактных тканей, а также в тканях дилатированной аорты у пациентов с аортальным клапаном различного строения.

Согласно ресурсу PlacView, в ткани аорты у 11 человек, в том числе восьми пациентов с аневризмой восходящей аорты и трех здоровых индивидов (Li Y. et al., 2020), гены *NFIX* и *LMO4* экспрессируются в существенном количестве ГМК и фибробластов на высоком уровне для гена *NFIX* и вполнину меньше для гена *LMO4* (рис. 3). Функциональная активность гена *PCDH7* зарегистрирована на высоком уровне в ГМК и в меньшей степени в фибробластах. Ген *DIP2C* экспрессируется на среднем уровне, но в небольшом количестве ГМК, фибробластов и тучных клеток. Активность *ARAP2* обнаружена в Т-, В-, и NK-клетках. Ген *MED13L* экспрессируется в широком спектре клеток на среднем уровне. Остальные ДМГ в тканях восходящей аорты экспрессируются не более чем в 20 % клеток (см. рис. 3).

Сравнительный анализ ДМГ с перечнем генов, ассоциированных с ИБС, аневризмой грудной аорты по результатам GWAS, двухстворчатым аортальным клапаном или генами наследственных аневризм аорты, показал, что





**Рис. 3.** Типы клеток и средний относительный уровень экспрессии выявленных в настоящем исследовании ДМГ в ресурсе PlacView, в наборе данных по отдельным клеткам восходящей аорты у 11 человек, в том числе восьми пациентов с аневризмой восходящей аорты и трех здоровых индивидов (Li Y. et al., 2020).

T cell – Т-клетки; SMC – гладкомышечные клетки; Plasma cell – плазматические; Pericyte cell – пероциты; NK – натуральные киллеры; Mφ – макрофаги; Mast cell – тучные клетки; FB – фибробласты; Erythrocyte – эритроциты; EC – эндотелиальные клетки; B cell – В-лимфоциты.

rs543659530 гена *PCDH7*, кодирующего протокадгерин 7, ассоциирован с ИБС у больных с сахарным диабетом второго типа (СД2) (Song et al., 2021), а rs61937394 гена *MED13L*, белковый продукт которого относится к медиаторному комплексу регуляции транскрипции, связан с развитием аневризмы восходящей аорты (Pirruccello et al., 2022). Остальные ДМГ не входят ни в один из этих списков.

## Обсуждение

Использование алгоритма деконволюции профилей метилирования ДНК и оценки клеточного состава с разработанным референсом для сосудов позволило заключить, что существенную долю клеток в восходящей аорте составляют ГМК и иммунные клетки. Степень инфильтрации сосудистой стенки иммунными клетками при расслоении восходящей аорты значительно превышает таковую в интактных тканях сосуда.

В исследовании (Pan et al., 2017) также выполнена поправка на клеточный состав, но с помощью другого алгоритма (Houseman CP). В результате авторами отмечено снижение среднего количества ГМК и увеличение

количества ЭК при расслоении аорты по сравнению с нормальной аортой и дилатированной/аневризматически расширенной аортой с ДАК (Pan et al., 2017). В нашей работе среднее количество ГМК и ЭК не различалось между группами, тогда как инфильтрация иммунными клетками была выше при расслоении аорты. Данный факт может свидетельствовать о роли воспалительного инфильтрата в нарушении целостности стенки аорты.

Надо также отметить, что по результатам алгоритма деконволюции в изученных образцах не обнаружено фибробластов, значительное количество которых ожидаемо на основании знаний о строении стенки аорты.

Применение технологий анализа транскриптома и эпигенома в отдельных клетках из образцов артерий человека и модельных животных позволило сделать вывод, что ГМК обладают обширной фенотипической пластичностью и вместе с фибробластами и пероцитами обычно составляют единый суперкластер клеток, происходящих из мезенхимальной стволовой клетки (Mosquera et al., 2023; Zhao et al., 2025).

Таким образом, мы полагаем, что «компонент ГМК» в результатах алгоритма деконволюции может вмещать комплекс разных клеточных типов (за исключением пероцитов), близких по профилю экспрессии генов и, по-видимому, метилирования ДНК, в том числе спектр дифференцированных и модулированных ГМК и фибробласты.

Проведение реанализа данных по метилированию ДНК в тканях аорты показало, что дилатация/аневризма с ДАК и расслоение восходящей аорты характеризуются разным статусом метилирования ДНК относительно интактной ткани аорты, поскольку данные фенотипы различаются между собой как по числу, так и по спектру ДМГ. Вместе с тем поправка на клеточный состав аннулирует основное количество ДМС, когда между дилатацией/аневризмой аорты с ДАК и интактной тканью остаются один CpG-сайт гена *DIP2C* и два сайта в межгенных регионах *TBX5/TBX3* и *TBX3/MED13L*. Между дилатацией/аневризмой и расслоением аорты обнаружено 10 дифференциально метилированных CpG-сайтов генов *DIP2C*, *LMO4*, *NFIX*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *PLEKHF1*, *NKD1*, *CYP2W1*, *PCDH7/ARAP2*, *TBX5/TBX3* и *TBX3/MED13L*.

Полученные результаты, по-видимому, в большей степени отражают различия в паттернах метилирования ДНК, связанные с вариативностью клеточного состава образцов, нежели со значимыми эпигенетическими различиями между пораженными и интактными тканями аорты. Это подтверждается экспрессионными исследованиями, проведенными ранее на разных типах тканей (интима-медиа и адвентиция аорты, а также интима-медиа внутренней грудной артерии), которые показали, что при попарном сравнении тканей от 22.5 до 52 % всех генов являются дифференциально экспрессирующимися (Folkersen et al., 2011).

Кроме того, в данных Gene Expression Omnibus, использованных для реанализа, не указано строение аортального клапана у больных с расслоением (GSE202047), или аортальный клапан трехстворчатый (GSE84274), так же как у здоровых доноров. В этом случае идентифицированные

ДМГ между сравниваемыми группами (АВА с ДАК/ИВА и АВА с ДАК/РВА) даже с поправкой на клеточный состав, возможно, отражают особенности метилирования ДНК тканей аорты, обусловленные строением аортального клапана, а не дилатацией аорты. Косвенно это подтверждается и тем, что самое большое число ДМГ, полученное при сравнении групп с трехстворчатым клапаном (РВА/ИВА), не отражает различий в паттернах метилирования ДНК пораженной и интактной ткани аорты с одинаковым строением аортального клапана, поскольку исчезает после поправки на клеточный состав.

Анализ метилирования ДНК в тканях аорты, проведенный другими научными группами, показал, как и в настоящем исследовании, что у больных с ДАК как при аневризме, так и в интактных тканях восходящей аорты выявляются гипометилированные регионы генов *DIP2C*, *LMO4*, *NFIX*, *NKD1* и *CYP2W1* (Björck et al., 2018). Более того, в целом в тканях восходящей аорты с двухстворчатым аортальным клапаном наблюдается значимо больше гипометилированных регионов относительно трехстворчатого, что сопровождается более активным транскрипционным профилем в тканях аорты с ДАК (Björck et al., 2018). Вместе с тем в атеросклеротической бляшке аорты относительно интактной ткани аорты тех же доноров, но где строение аортального клапана не указано, обнаружены гиперметилированные CpG-сайты генов *DIP2C*, *NFIX*, *NKD1* и *ARAP2* (Zaina et al., 2014).

Различия в строении аортального клапана приводят и к различиям функционирования восходящей аорты, которые во многом определяются асимметричностью распределения скорости кровотока при ДАК, что способствует большей частоте развития патологий восходящего отдела (Viscardi et al., 2010). При аневризме восходящей аорты у пациентов с ДАК и ТАК гемодинамические нарушения являются основным фактором, приводящим к различиям не только в структурной организации ткани сосуда, но и в функциональном профиле генома, который обуславливает формирование уникальных паттернов экспрессирующихся генов, микроРНК и белков, при одном и том же клиническом фенотипе (Folkersen et al., 2011; Kjellqvist et al., 2013; Gallo et al., 2018; Freiholtz et al., 2023). Между группами с ДАК и ТАК при аневризме восходящей аорты идентифицированы различия в экспрессионных профилях как в тканях восходящей аорты, так и в отдельных типах клеток, но списки дифференциально экспрессированных генов не включают обнаруженных в настоящем исследовании ДМГ (Lei et al., 2022; Doppler et al., 2023; Huang M. et al., 2023).

В этиологии ДАК важную роль играют генетические факторы, коэффициент наследуемости которых составляет 47–89 % (Gehlen et al., 2023). Ассоциативные исследования, GWAS и анализ редких клинически значимых вариантов привели к обнаружению более четырех десятков генов, ассоциированных с развитием ДАК (Gago-Díaz et al., 2017; Chen S. et al., 2022; Gehlen et al., 2023; Carlisle et al., 2024; Sticchi et al., 2025). Выявленные в нашей работе гены не входят в число ассоциированных с развитием ДАК, но связаны с другими сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Так, ген *DIP2C* принимает участие в связывании

транскрипционных факторов, а его дефицит приводит к развитию врожденных пороков сердца (Xia et al., 2025).

Белковые продукты генов *NFIX* и *LMO4* являются транскрипционными факторами. Клинически значимые варианты гена *NFIX* ассоциированы с аневризмой и расслоением грудной аорты при синдроме Малана (Oshima et al., 2017; Chevarin et al., 2020), а *LMO4* сверхэкспрессируется в областях с турбулентным кровотоком, в том числе в области малой кривизны дуги аорты, сонных и коронарных артериях, что предполагает потенциальную роль данного гена в механочувствительности и проатерогенном ответе (Ni et al., 2010). Ген *C10orf41* (*ZNF503-AS2*) кодирует длинную некодирующую РНК (lncRNA). Повышение уровня метилирования гена *ZNF503-AS2* выявлено в плазме крови пациентов с инфарктом миокарда после чрескожного коронарного вмешательства относительно здоровых доноров (Ren et al., 2022).

*PLEKHF1* – лизосомально-ассоциированный белок, индуцирующий апоптоз и аутофагию. Известно, что аутофагия тесно связана с возникновением и развитием атеросклероза, ишемии/реперфузии миокарда, сердечной недостаточности и аортопатии в сочетании с ДАК (Forte et al., 2019; Jiang B. et al., 2023). *PLEKHF1* – один из восьми генов, связанных с общей выживаемостью при дилатационной кардиомиопатии, а его экспрессия понижена в тканях миокарда у больных по сравнению с контрольной группой (Zhang et al., 2022). В целом ген *PLEKHF1* рассматривается как потенциальный биомаркер развития ИБС при СД2 и кардиомиопатии (Huang Q. et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Белковый продукт гена *NKD1* – это ингибитор сигнального пути Wnt, который необходим для генерации клеток-предшественников сердца, миграции и дифференцировки клеток нервного гребня, формирования выводного тракта и клапанов сердца (Weerackoon et al., 2021). Нарушения функционирования сигнального пути Wnt считаются одним из факторов, влияющих на развитие ССЗ, в том числе структурных аномалий аорты, что непосредственно связано с предрасположенностью к аневризмам (Pozo-Vilumbrales et al., 2025).

Варианты гена транскрипционного фактора *TBX5*, который необходим для формирования предсердной и желудочковой перегородок и проводящей системы сердца, связаны с развитием врожденных пороков сердца, синдромами Холт–Орама и Бругада, фибрилляцией предсердий, острого инфаркта миокарда и ДАК (Steimle, Moskowitz, 2017; Wang F. et al., 2017; Wang S. et al., 2019; Jiang W.F. et al., 2020). *TBX3* – фактор транскрипции, который важен для дифференциации синоатриального и атриовентрикулярного узлов. Варианты гена *TBX3* связаны с нарушением сердечной проводимости, развитием атриовентрикулярной блокады, гипертрофической кардиомиопатии, фибрилляции предсердий и сердечной недостаточности (Lakda et al., 2025).

*ARAP2* – белок, активирующий ГТФазу Arf6, участвует в регуляции фокальной адгезии, ремоделировании актинового цитоскелета и рециркуляции интегринов в клетках сосудов (Vitali et al., 2019). Изменение активности гена

*ARAP2* в аорте в мышиных моделях (линия *Eln*<sup>-/-</sup>) отражает модуляцию клеточного цитоскелета и межклеточных взаимодействий в сосудистой стенке аорты при тяжелых дефектах эластических волокон (Staiculescu et al., 2018). У человека однонуклеотидный вариант rs116215256 гена *ARAP2* ассоциирован с уровнем сердечного тропонина I, который, как известно, является одним из регуляторов сокращения миокарда (Yang et al., 2021).

Ген *PCDH7* кодирует протокадгерин 7 – мембранный белок, участвующий в распознавании и адгезии клеток друг к другу. Семейство кадгеринов играет ключевую роль в морфогенезе, а также в развитии различных патологических состояний, в том числе ССЗ, таких как дилатационная кардиомиопатия, атеросклероз и рестеноз, при которых происходит значительное ремоделирование тканевой архитектуры, приводящее к клиническим проявлениям заболеваний (Joshi et al., 2024).

Ген *MED13L* кодирует одну из субъединиц большого медиаторного комплекса, который участвует в процессе регуляции транскрипционной активности генов различных сигнальных путей на ранних стадиях развития, включая развитие сердца (Henry et al., 2025). Патогенные варианты в гене *MED13L* связывают с транспозицией магистральных артерий, коарктацией аорты и другими ССЗ (Schiano, Napoli, 2025).

Таким образом, выявленные в настоящем исследовании гены играют важную роль в развитии сердечно-сосудистой системы, а нарушение их функционирования может приводить к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Связь данных генов с дилатацией/аневризмой аорты у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном через изменение их эпигенетической регуляции в тканях пораженной аорты выявлена нами впервые.

## Заключение

Оценка клеточного состава по профилю метилирования ДНК в образцах тканей аорты позволяет составить представление о наличии воспаления, оцениваемого по степени инфильтрации стенки артерии иммунными клетками, и может охарактеризовать роль воспалительного инфильтрата в нарушении целостности стенки аорты, а также очертить гены, отражающие различия, связанные с изучаемыми фенотипами, а не с клеточной гетерогенностью образцов.

Гены *NFIX*, *PCDH7*, *MED13L*, *LMO4*, *DIP2C*, *PLEKHF1*, *NKD1*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *ARAP2*, *TBX3*, *TBX5* могут рассматриваться как новые гены-кандидаты развития дилатации/аневризмы аорты у пациентов с двухстворчатым аортальным клапаном. Особого внимания заслуживают гены *NFIX*, *LMO4*, *DIP2C*, *C10orf41* (*ZNF503-AS2*), *MED13L*, *TBX3*, *TBX5*, являющиеся транскрипционными факторами или регуляторами транскрипционной активности ДНК, а также ген *NKD1* – ингибитор сигнального пути Wnt.

Кроме того, полученные данные еще раз подтверждают необходимость строгого подхода к формированию групп сравнения с четким и полным описанием изучаемого фенотипа и проведения исследований на уровне отдельных клеток.

## Список литературы / References

- Гончарова И.А., Зарубин А.А., Шипулина С.А., Королёва Ю.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Профиль метилирования ДНК при коморбидности аневризмы и атеросклероза восходящей аорты. *Молекулярная биология*. 2024;58(3):414-424. doi 10.31857/S0026898424030069
- [Goncharova I.A., Zarubin A.A., Shipulina S.A., Koroleva Iu.A., Panfilov D.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. DNA methylation profiling in aneurysm and comorbid atherosclerosis of the ascending aorta. *Mol Biol*. 2024;58(3):439-449. doi 10.1134/s0026893324700079]
- Королёва Ю.А., Гончарова И.А., Зарубин А.А., Шипулина С.А., Слепцов А.А., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Разнонаправленное изменение уровня метилирования CpG-сайтов в 5' регионе гена *TBX20* в восходящей аорте при атеросклерозе и аневризме. *Генетика*. 2024;60(7):100-106. doi 10.31857/S0016675824070091
- [Koroleva Iu.A., Goncharova I.A., Zarubin A.A., Shipulina S.A., Sleptsov A.A., Panfilov D.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. Methylation levels in the 5' region of the *TBX20* gene in the ascending aorta change in opposite direction in atherosclerosis and aneurysm. *Russ J Genet*. 2024;60(7):977-981. doi 10.1134/S102279542470042X]
- Марков А.В., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Назаренко М.С. Оценка соотношения разных типов клеток при изучении метилирования ДНК в образцах артерий пациентов с атеросклерозом. В: Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины. Томск, 2020;45-47
- [Markov A.V., Zarubin A.A., Sharysh D.V., Nazarenko M.S. Evaluation of the ratio of different cell types in the study of DNA methylation in arterial samples from patients with atherosclerosis. In: Current Issues in Fundamental and Clinical Medicine. Tomsk, 2020;45-47 (in Russian)]
- Björck H.M., Du L., Pulignani S., Paloschi V., Lundströmer K., Kostina A.S., Österholm C., ... Teixidó-Tura G., Maleki S., Franco-Cereceda A., Eriksson P.; Mechanistic Interrogation of Bicuspid Aortic Valve associated Aortopathy (MIBAVA) Leducq Consortium. Altered DNA methylation indicates an oscillatory flow mediated epithelial-to-mesenchymal transition signature in ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve. *Sci Rep*. 2018;8(1):2777. doi 10.1038/s41598-018-20642-4
- Carlisle S.G., Albasha H., Michelena H.I., Sabate-Rotes A., Bianco L., De Backer J., Mosquera L.M., ... Milewicz D.M., Body S.C., Prakash S.K.; EBAV Investigators; BAVCon Investigators. Rare genomic copy number variants implicate new candidate genes for bicuspid aortic valve. *PLoS One*. 2024;19(9):e0304514. doi 10.1371/journal.pone.0304514
- Chen S., Jin Q., Hou S., Li M., Zhang Y., Guan L., Pan W., Ge J., Zhou D. Identification of recurrent variants implicated in disease in bicuspid aortic valve patients through whole-exome sequencing. *Hum Genomics*. 2022;16(1):36. doi 10.1186/s40246-022-00405-z
- Chen Y., Xu X., Chen Z., Huang B., Wang X., Fan X. DNA methylation alternation in Stanford – a acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):455. doi 10.1186/s12872-022-02882-5
- Chevarin M., Duffourd Y., Barnard R.A., Moutton S., Lecoquierre F., Daoud F., Kuentz P., ... Deleuze J.F., Thauvin-Robinet C., Rivière J.B., O'Roak B.J., Faivre L. Excess of de novo variants in genes involved in chromatin remodelling in patients with marfanoid habitus and intellectual disability. *J Med Genet*. 2020;57(7):466-474. doi 10.1136/jmedgenet-2019-106425
- Doppler C., Messner B., Mimler T., Schachner B., Rezk M., Ganhör C., Wechselberger C., Müller M., Puh S., Pröll J., Arbeithuber B., Müller T., Zierer A., Bernhard D. Noncanonical atherosclerosis as the driving force in tricuspid aortic valve associated aneurysms – a trace collection. *J Lipid Res*. 2023;64(3):100338. doi 10.1016/j.jlr.2023.100338
- Elbitar S., Renard M., Arnaud P., Hanna N., Jacob M.P., Guo D.C., Tsutsui K., ... Michel J.B., Jondeau G., Sakai L.Y., Boileau C., Abifadel M. Pathogenic variants in *THSD4*, encoding the ADAMTS-



- like 6 protein, predispose to inherited thoracic aortic aneurysm. *Genet Med.* 2021;23(1):111-122. doi 10.1038/s41436-020-00947-4
- Folkersen L., Wågsäter D., Paloschi V., Jackson V., Petrini J., Kurtovic S., Maleki S., ... Michel J.B., Liska J., Gabrielsen A., Franco-Cereceda A., Eriksson P. Unraveling divergent gene expression profiles in bicuspid and tricuspid aortic valve patients with thoracic aortic dilatation: the ASAP study. *Mol Med.* 2011;17(11-12):1365-1373. doi 10.2119/molmed.2011.00286
- Forte A., Cipollaro M., De Feo M., Della Corte A. Is there a role for autophagy in ascending aortopathy associated with tricuspid or bicuspid aortic valve? *Clin Sci (Lond).* 2019;133(7):805-819. doi 10.1042/CS20181092
- Freiholtz D., Bergman O., Lång K., Poujade F.A., Paloschi V., Granath C., Lindeman J.H.N., Olsson C., Franco-Cereceda A., Eriksson P., Björck H.M. Bicuspid aortic valve aortopathy is characterized by embryonic epithelial to mesenchymal transition and endothelial instability. *J Mol Med (Berl).* 2023;101(7):801-811. doi 10.1007/s00109-023-02316-5
- Gago-Díaz M., Brion M., Gallego P., Calvo F., Robledo-Carmona J., Saura D., Sánchez V., ... Carracedo Á., Muehlschlegel J.D., García-Dorado D., Body S.C., Evangelista A. The genetic component of bicuspid aortic valve and aortic dilation. An exome-wide association study. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;102:3-9. doi 10.1016/j.jmcc.2016.11.012
- Gallo A., Agnese V., Coronello C., Raffa G.M., Bellavia D., Conaldi P.G., Pilato M., Pasta S. On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Int J Cardiol.* 2018;273:230-236. doi 10.1016/j.ijcard.2018.10.005
- Gehlen J., Stundl A., Debiec R., Fontana F., Krane M., Sharipova D., Nelson C.P., ... Abdelilah-Seyfried S., Samani N.J., Erdmann J., Trenkwalder T., Schumacher J. Elucidation of the genetic causes of bicuspid aortic valve disease. *Cardiovasc Res.* 2023;119(3):857-866. doi 10.1093/cvr/cvac099
- Henry K.M., Gardner R.N., Oppman A.M., Daneshgar N., Rosales M., Martins I., Baskin K.K., Grueter C.E. Med13 and Med13L: critical redundant players in basal cardiac function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol Plus.* 2025;13:100481. doi 10.1016/j.jmccpl.2025.100481
- Houseman E.A., Kim S., Kelsey K.T., Wiencke J.K. DNA methylation in whole blood: uses and challenges. *Curr Environ Health Rep.* 2015;2(2):145-154. doi 10.1007/s40572-015-0050-3
- Houseman E.A., Kile M.L., Christiani D.C., Ince T.A., Kelsey K.T., Marsit C.J. Reference-free deconvolution of DNA methylation data and mediation by cell composition effects. *BMC Bioinformatics.* 2016;17:259. doi 10.1186/s12859-016-1140-4
- Huang M., Guan R., Qiu J., Gnamey A.J.E., Wang Y., Tian H., Sun H., Shi H., Sun W., Jia X., Wu J. Identification of immune-related signatures and pathogenesis differences between thoracic aortic aneurysm patients with bicuspid versus tricuspid valves via weighted gene co-expression network analysis. *PLoS One.* 2023;18(10):e0292673. doi 10.1371/journal.pone.0292673
- Huang Q., Deng G., Wei R., Wang Q., Zou D., Wei J. Comprehensive identification of key genes involved in development of diabetes mellitus-related atherogenesis using weighted gene correlation network analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:580573. doi 10.3389/fcvm.2020.580573
- Jiang B., Zhou X., Yang T., Wang L., Feng L., Wang Z., Xu J., Jing W., Wang T., Su H., Yang G., Zhang Z. The role of autophagy in cardiovascular disease: cross-interference of signaling pathways and underlying therapeutic targets. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1088575. doi 10.3389/fcvm.2023.1088575
- Jiang W.F., Xu Y.J., Zhao C.M., Wang X.H., Qiu X.B., Liu X., Wu S.H., Yang Y.Q. A novel TBX5 mutation predisposes to familial cardiac septal defects and atrial fibrillation as well as bicuspid aortic valve. *Genet Mol Biol.* 2020;43(4):e20200142. doi 10.1590/1678-4685-GMB-2020-0142
- Joshi D., Coon B.G., Chakraborty R., Deng H., Yang Z., Babar M.U., Fernandez-Tussy P., ... Traylor J.G., Jr., Orr A.W., Fernandez-Hernando C., Liberos S., Schwartz M.A. Endothelial  $\gamma$ -protocadherins inhibit KLF2 and KLF4 to promote atherosclerosis. *Nat Cardiovasc Res.* 2024;3(9):1035-1048. doi 10.1038/s44161-024-00522-z
- Kim J.H., Na C.Y., Choi S.Y., Kim H.W., Du Kim Y., Kwon J.B., Chung M.Y., Hong J.M., Park C.B. Integration of gene-expression profiles and pathway analysis in ascending thoracic aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2010;24(4):538-549. doi 10.1016/j.avsg.2010.01.007
- Kjellqvist S., Maleki S., Olsson T., Chwastyniak M., Branca R.M., Lehtiö J., Pinet F., Franco-Cereceda A., Eriksson P. A combined proteomic and transcriptomic approach shows diverging molecular mechanisms in thoracic aortic aneurysm development in patients with tricuspid- and bicuspid aortic valve. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(2):407-425. doi 10.1074/mcp.M112.021873
- Lakda S., Davies R.H., Hingorani A.D., Paliwal N. A systematic review of GWAS on CMR imaging traits: genetic insights into cardiovascular structure, function, and diseases. *EBioMedicine.* 2025;121:105992. doi 10.1016/j.ebiom.2025.105992
- Lei C., Kan H., Chen W., Yang D., Ren J., Xu F., Zhang H., Wang W., Zheng Y. Different gene co-expression patterns of aortic intima-media and adventitia in thoracic aortic aneurysm. *Gene.* 2022;819:146233. doi 10.1016/j.gene.2022.146233
- Li N., Lin H., Zhou H., Zheng D., Xu G., Shi H., Zhu X., Gao J., Shao G., Sun L. Efficient detection of differentially methylated regions in the genome of patients with thoracic aortic dissection and association with MMP2 hypermethylation. *Exp Ther Med.* 2020;20(2):1073-1081. doi 10.3892/etm.2020.8753
- Li Y., Ren P., Dawson A., Vasquez H.G., Ageedi W., Zhang C., Luo W., ... Cassis L.A., Coselli J.S., Daugherty A., Shen Y.H., LeMaire S.A. Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic cell populations and differential gene expression patterns in control and aneurysmal human aortic tissue. *Circulation.* 2020;142(14):1374-1388. doi 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046528
- Li Y., Gao S., Han Y., Song L., Kong Y., Jiao Y., Huang S., Du J., Li Y. Variants of focal adhesion scaffold genes cause thoracic aortic aneurysm. *Circ Res.* 2021;128(1):8-23. doi 10.1161/CIRCRESAHA.120.317361
- Liu P., Zhang J., Du D., Zhang D., Jin Z., Qiu W., Zhou X., ... Ma J., Sun S., Fu W., Liu Y., Wang L. Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of *Hox* genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):124. doi 10.1186/s13148-021-01110-9
- Lokk K., Modhukur V., Rajashekar B., Märtens K., Mägi R., Kolde R., Koltšina M., Nilsson T.K., Vilo J., Salumets A., Tõniss N. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol.* 2014;15(4):r54. doi 10.1186/gb-2014-15-4-r54
- Mosquera J.V., Auguste G., Wong D., Turner A.W., Hodonsky C.J., Alvarez-Yela A.C., Song Y., ... Finn A.V., van der Laan S.W., Zang C., Sheffield N.C., Miller C.L. Integrative single-cell meta-analysis reveals disease-relevant vascular cell states and markers in human atherosclerosis. *Cell Rep.* 2023;42(11):113380. doi 10.1016/j.celrep.2023.113380
- Ni C.W., Qiu H., Rezvan A., Kwon K., Nam D., Son D.J., Visvader J.E., Jo H. Discovery of novel mechanosensitive genes in vivo using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow. *Blood.* 2010;116(15):e66-e73. doi 10.1182/blood-2010-04-278192
- Oshima T., Hara H., Takeda N., Hasumi E., Kuroda Y., Taniguchi G., Inuzuka R., Nawata K., Morita H., Komuro I. A novel mutation of *NFLX* causes Sotos-like syndrome (Malan syndrome) complicated with thoracic aortic aneurysm and dissection. *Hum Genome Var.* 2017;4:17022. doi 10.1038/hgv.2017.22
- Pan S., Lai H., Shen Y., Breeze C., Beck S., Hong T., Wang C., Teschen-dorff A.E. DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):692-704. doi 10.1093/cvr/cvx050

- Pirruccello J.P., Chaffin M.D., Chou E.L., Fleming S.J., Lin H., Nekoui M., Khurshid S., ... Hoffmann U., Lubitz S.A., Philippakis A.A., Lindsay M.E., Ellinor P.T. Deep learning enables genetic analysis of the human thoracic aorta. *Nat Genet.* 2022;54(1):40-51. doi 10.1038/s41588-021-00962-4
- Pozo-Vilumbrales B., Martín-Chaves L., López-Unzu M.A., Soto-Navarrete M.T., Pavón-Morón F.J., Rodríguez-Capitán J., Fernández B. Unraveling the molecular complexity of bicuspid aortopathy: lessons from comparative proteomics. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2025;1871(3):167679. doi 10.1016/j.bbadis.2025.167679
- Ren J., Jiang L., Liu X., Liao Y., Zhao X., Tang F., Yu H., Shao Y., Wang J., Wen L., Song L. Heart-specific DNA methylation analysis in plasma for the investigation of myocardial damage. *J Transl Med.* 2022;20(1):36. doi 10.1186/s12967-022-03234-9
- Schiano C., Napoli C. Mediator complex: update of key insights into transcriptional regulation of ancestral framework and its role in cardiovascular diseases. *Eur J Med Res.* 2025;30(1):507. doi 10.1186/s40001-025-02720-2
- Shah A.A., Gregory S.G., Krupp D., Feng S., Dorogi A., Haynes C., Grass E., Lin S.S., Hauser E.R., Kraus W.E., Shah S.H., Hughes G.C. Epigenetic profiling identifies novel genes for ascending aortic aneurysm formation with bicuspid aortic valves. *Heart Surg Forum.* 2015;18(4):E134-E139. doi 10.1532/hsf.1247
- Song Y., Choi J.E., Kwon Y.J., Chang H.J., Kim J.O., Park D.H., Park J.M., Kim S.J., Lee J.W., Hong K.W. Identification of susceptibility loci for cardiovascular disease in adults with hypertension, diabetes, and dyslipidemia. *J Transl Med.* 2021;19(1):85. doi 10.1186/s12967-021-02751-3
- Staiculescu M.C., Coccione A.J., Procknow J.D., Kim J., Wagen-seil J.E. Comparative gene array analyses of severe elastic fiber defects in late embryonic and newborn mouse aorta. *Physiol Genomics.* 2018;50(11):988-1001. doi 10.1152/physiolgenomics.00080.2018
- Steimle J.D., Moskowitz I.P. *TBX5*: a key regulator of heart development. *Curr Top Dev Biol.* 2017;122:195-221. doi 10.1016/bs.ctdb.2016.08.008
- Sticchi E., De Caro R., Suraci S., Kura A., Berteotti M., Squillantini L., Barbieri G., ... Gori A.M., Marcucci R., Pepe G., Nistri S., Giusti B. Bicuspid aortic valve: old and novel gene contribution to disease onset and complications. *Diagnostics (Basel).* 2025;16(1):104. doi 10.3390/diagnostics16010104
- Viscardi F., Vergara C., Antiga L., Merelli S., Veneziani A., Puppini G., Faggian G., Mazzucco A., Luciani G.B. Comparative finite element model analysis of ascending aortic flow in bicuspid and tricuspid aortic valve. *Artif Organs.* 2010;34(12):1114-1120. doi 10.1111/j.1525-1594.2009.00989.x
- Vitali T., Giraldo-Berlingieri S., Randazzo P.A., Chen P.W. Arf GAPs: a family of proteins with disparate functions that converge on a common structure, the integrin adhesion complex. *Small GTPases.* 2019;10(4):280-288. doi 10.1080/21541248.2017.1299271
- Wang F., Liu D., Zhang R.R., Yu L.W., Zhao J.Y., Yang X.Y., Jiang S.S., Ma D., Qiao B., Zhang F., Jin L., Gui Y.H., Wang H.Y. A *TBX5* 3'UTR variant increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Cell Discov.* 2017;3:17026. doi 10.1038/celldisc.2017.26
- Wang S., Zhang J., He X., Zhang Y., Chen J., Su Q., Pang S., Zhang S., Cui Y., Yan B. Identification and functional analysis of genetic variants in *TBX5* gene promoter in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):265. doi 10.1186/s12872-019-1237-6
- Weerackoon N., Gunawardhana K.L., Mani A. Wnt signaling cascades and their role in coronary artery health and disease. *J Cell Signal.* 2021;2(1):52-62. doi 10.33696/Signaling.2.035
- Xia Y., Zhang M., Song R., Wu H., Deng J., Huang S., Yang Y. The deficiency of *DIP2C* leads to congenital heart defects in patients with 10p15.3 microdeletion syndrome. *Gene.* 2025;969:149753. doi 10.1016/j.gene.2025.149753
- Yang Y., Bartz T.M., Brown M.R., Guo X., Zilhão N.R., Trompet S., Weiss S., ... Rotter J.I., Boerwinkle E., Fornage M., Jun G., Yu B. Identification of functional genetic determinants of cardiac troponin T and I in a multiethnic population and causal associations with atrial fibrillation. *Circ Genom Precis Med.* 2021;14(6):e003460. doi 10.1161/CIRCGEN.121.003460
- Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7(5):692-700. doi 10.1161/CIRCGENETICS.113.000441
- Zhang F., Xia M., Jiang J., Wang S., Zhao Q., Yu C., Yu J., Xian D., Li X., Zhang L., Liu Y., Peng M. Machine learning and bioinformatics to identify 8 autophagy-related biomarkers and construct gene regulatory networks in dilated cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2022;12(1):15030. doi 10.1038/s41598-022-19027-5
- Zhao Q., Pedroza A., Sharma D., Gu W., Dalal A., Weldy C., Jackson W., ... Kundaje A., Fischbein M., Wirka R., Quertermous T., Cheng P. A cell and transcriptome atlas of human arterial vasculature. *Cell Genom.* 2025;5(12):101034. doi 10.1016/j.xgen.2025.101034
- Zheng S.C., Breeze C.E., Beck S., Dong D., Zhu T., Ma L., Ye W., Zhang G., Teschendorff A.E. EpiDISH web server: Epigenetic Dissection of Intra-Sample-Heterogeneity with online GUI. *Bioinformatics.* 2019;36(6):1950-1951. doi 10.1093/bioinformatics/btz833

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.02.2026. После доработки 15.05.2026. Принята к публикации 15.05.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-95

## Клинический случай X-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии, вызванной дупликацией Xq13.1, затрагивающей ген *EDA*

В.И. Степаненко , И.Ж. Жалсанова , Е.А. Фонова , А.С. Зуев , С.Н. Государкина , Т.Н. Киреева ,  
Е.Г. Равжаева<sup>1</sup>, А.А. Агафонова , Г.Н. Сеитова , А.С. Монахова , Н.А. Скрыбин 

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра  
Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup> ООО «Биотехнологический кампус», Москва, Россия

 vsevolod.stepanenko@medgenetics.ru

**Аннотация.** X-сцепленная гипогидротическая эктодермальная дисплазия (синдром Криста–Сименса–Турена, МКБ-10: Q82.4) представляет собой наиболее распространенную форму эктодермальной дисплазии, вызванной наследственными нарушениями развития производных эктодермы. Заболевание существенно влияет на качество жизни пациентов, проявляясь классической триадой симптомов: гипогидрозом, гипотрихозом и гиподонтией, что создает риски нарушения терморегуляции и требует сложной стоматологической реабилитации. Молекулярной основой патологии служат нарушения в гене *EDA*, ответственном за синтез эктодисплазина-А. Данный белок принадлежит к семейству фактора некроза опухоли (TNF) и играет критическую сигнальную роль в процессе эктодермально-мезенхимальных взаимодействий во время эмбрионального развития. В настоящей работе описан клинический случай мальчика с фенотипом X-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии, обусловленный ранее не описанной структурной перестройкой. Методом полногеномного секвенирования (WGS) была выявлена микродупликация локуса Xq13.1 размером приблизительно 397.3 Кб, непосредственно затрагивающая ген *EDA*. Комплексный биоинформатический анализ подтвердил отсутствие дополнительных патогенных или вероятно патогенных вариантов в других генах, которые могли обуславливать фенотип пациента. Микродупликация Xq13.1 подтверждена у пробанда и его матери методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Анализ метилирования гена *AR* продемонстрировал у матери равновероятную инактивацию X-хромосомы (74/26 %), что объясняет ее бессимптомное носительство. Проведено сравнение клинических проявлений пробанда с описанными в литературе пациентами, имеющими близкие по координатам структурные перестройки. На основании международных и российских руководств по интерпретации данных массового параллельного секвенирования обнаруженный вариант классифицирован как патогенный. Идентификация этой структурной перестройки расширяет известный мутационный спектр гена *EDA*. Уточнение молекулярно-генетического диагноза в описанной семье имеет критическое значение не только для верификации нозологии, но и для коррекции тактики ведения пациента, включая междисциплинарный подход к лечению. Кроме того, это позволяет провести качественное медико-генетическое консультирование, выявить носительство у родственников женского пола и разработать эффективные меры первичной и вторичной профилактики заболевания в данной семье.

**Ключевые слова:** эктодермальная дисплазия; гипогидротическая дисплазия; синдром Криста–Сименса–Турена; *EDA*; вариации числа копий участков ДНК (CNV); массовое параллельное секвенирование (МПС)

**Для цитирования:** Степаненко В.И., Жалсанова И.Ж., Фонова Е.А., Зуев А.С., Государкина С.Н., Киреева Т.Н., Равжаева Е.Г., Агафонова А.А., Сеитова Г.Н., Монахова А.С., Скрыбин Н.А. Клинический случай X-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии, вызванной дупликацией Xq13.1, затрагивающей ген *EDA*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):949-954. doi 10.18699/vjgb-26-95

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 122013100190-6.

## A clinical case of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by an Xq13.1 duplication affecting the *EDA* gene

V.I. Stepanenko , I.Zh. Zhalsanova , E.A. Fonova , A.S. Zuev , S.N. Gosudarkina , T.N. Kireeva ,  
E.G. Ravzhaeva<sup>1</sup>, A.A. Agafonova , G.N. Seitova , A.S. Monakhova , N.A. Skryabin 

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> LLC "Biotech Campus", Moscow, Russia

 vsevolod.stepanenko@medgenetics.ru

© Степаненко В.И., Жалсанова И.Ж., Фонова Е.А., Зуев А.С., Государкина С.Н., Киреева Т.Н., Равжаева Е.Г., Агафонова А.А., Сеитова Г.Н., Монахова А.С., Скрыбин Н.А., 2026

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0



**Abstract.** X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED; Christ–Siemens–Touraine syndrome, ICD-10: Q82.4) is the most common type of ectodermal dysplasia, caused by genetic disorders of ectodermal derivatives. The condition significantly impacts patients' quality of life, presenting with a classic triad of hypohidrosis, hypotrichosis and hypodontia, which creates a risk of impaired thermoregulation and necessitates complex dental rehabilitation. The molecular basis of the disease lies in alterations of the *EDA* gene, which encodes ectodysplasin A. This protein belongs to the tumor necrosis factor (TNF) family and plays a critical signaling role in ectodermal-mesenchymal interactions during embryonic development. The present case report describes a boy with an XLHED phenotype caused by a previously unreported structural rearrangement. Whole-genome sequencing (WGS) identified a ~397.3 kb microduplication at the Xq13.1 locus directly involving the *EDA* gene. Comprehensive bioinformatic analysis ruled out additional pathogenic or likely pathogenic variants in other genes that could account for the patient's phenotype. The Xq13.1 microduplication was confirmed in both the proband and his mother using quantitative real-time PCR (qPCR). Androgen receptor (*AR*) gene methylation analysis in the mother revealed a random X-chromosome inactivation (74/26 %), explaining her asymptomatic carrier status. The proband's clinical manifestations were also compared to those of literature-reported patients with overlapping genomic rearrangements. Based on international and Russian guidelines for the interpretation of massively parallel sequencing data, the identified variant was classified as pathogenic. Identification of this structural rearrangement expands the known mutational spectrum of the *EDA* gene. Establishing a precise molecular genetic diagnosis in this family is critical not only for disease verification but also for optimizing patient management through a multidisciplinary approach. Furthermore, it enables comprehensive genetic counseling, identification of female carriers among relatives and the development of timely primary and secondary prevention measures for the disease in this family.

**Key words:** ectodermal dysplasia; hypohidrotic; Christ–Siemens–Touraine syndrome; *EDA*; copy number variations (CNV); next-generation sequencing (NGS)

**For citation:** Stepanenko V.I., Zhalsanova I.Zh., Fonova E.A., Zuev A.S., Gosudarkina S.N., Kireeva T.N., Ravzhaeva E.G., Agafonova A.A., Seitova G.N., Monakhova A.S., Skryabin N.A. A clinical case of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by an Xq13.1 duplication affecting the *EDA* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(6):949-954. doi 10.18699/vjgb-26-95

## Введение

Эктодермальная дисплазия – генетически и клинически гетерогенная группа заболеваний, связанных с поражением двух или более производных эктодермы, таких как потовые железы, волосы и зубы (Visinoni et al., 2009). Гипогидротическая эктодермальная дисплазия – группа эктодермальных дисплазий, характерная клиническая особенность которой состоит в снижении функции потовых желез, с чем связано нарушение терморегуляции (Anbouba et al., 2020; Wohlfart et al., 2020). В 90 % случаев гипогидротическая эктодермальная дисплазия вызвана патогенными вариантами в четырех генах: *EDA* (X-сцепленные формы), *EDAR*, *EDARADD* (ответственны одновременно за аутосомно-доминантные и аутосомно-рецессивные формы) и *WNT10A* (аутосомно-рецессивные формы) (Cluzeau et al., 2011).

X-сцепленная гипогидротическая эктодермальная дисплазия (синдром Криста–Сименса–Турена, XLHED) (OMIM # 305100) – наследственное заболевание, поражающее структуры эктодермального происхождения, такие как волосы, зубы, ногти и потовые железы. Причиной заболевания считают патогенетически значимые варианты гена *EDA*, отвечающего за синтез белка эктодисплазина-A, который принадлежит к лигандам семейства фактора некроза опухоли (TNF) и играет важную роль в формировании структур эктодермального происхождения во время эмбриогенеза (Kere et al., 1996; Mikkola, Thesleff, 2003). Согласно литературным данным, X-сцепленная гипогидротическая эктодермальная дисплазия – наиболее распространенная в мире форма гипогидротической эктодермальной дисплазии (Lamartine, 2003). Распространенность заболевания составляет, по разным оценкам, от 1 до 22 на 100 000 человек (Cañueto et al., 2011; Nguyen-Nielsen et al., 2013). Клиническая картина заболевания представляет со-

бой различные сочетание следующих проявлений: гипогидроз, гипотрихоз и гиподонтия (Itin, Fistarol, 2004; Bagdey et al., 2022). В настоящей работе представлен клинический случай с ранее не описанной дупликацией хромосомного региона Xq13.1.

## Материалы и методы

В исследовании приняла участие семья с подозрением на эктодермальную дисплазию у сына. Исследование проводили с соблюдением этических норм в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Было получено информированное согласие всех членов семьи на участие в эксперименте. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 10 от 20.01.2021).

Периферическую кровь пациента и его родителей собирали в пробирки, содержащие ЭДТА, для молекулярно-генетического анализа. Выделение геномной ДНК из крови осуществляли с помощью фенол-хлороформного метода.

Исследование генома пациента проведено в рамках совместной научно-исследовательской программы с Национальной генетической инициативой «100 000+Я» на базе ООО «Биотек кампус». Полногеномное секвенирование проводили на секвенаторах DNBSEQ-T7 (MGI) с помощью реагентного набора для приготовления библиотек MGIEasy FS PCR-Free Library Prep Set (MGI). Длина прочтений составила 2 × 150 п. н. Биоинформатический пайплайн содержит шаги очистки данных от адаптерных и низкокачественных последовательностей, с последующим картированием прочтений на референсный геном GRCh38 с помощью программы bwa mem v0.7.17 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Дублицированные прочтения размечали с помощью программы GATK MarkDuplicates v4.3.0.0

(McKenna et al., 2010). Коллинг точечных вариантов проводили с помощью программы DeepVariant v4.0.0. Для каждого образца число прочтений с качеством не менее Q30 составило не менее 90 % от числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

Для аннотирования применяли программу Annotvar (Wang et al., 2010). Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы базы данных OMIM (<http://www.omim.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), gnomAD v4.1.0 exomes (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), HPO (<https://hpo.jax.org/>), Decipher (<https://www.deciphergenomics.org/>) и литературные данные.

Для подтверждения микродупликации Xq13.1 проведена количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (Real-Time PCR) с использованием следующих праймеров: на экзон 2 гена *EDA* (F5'-TGGCTATGACTGAGTGGGGT-3'; R5'-GCTTCTTTTATTGCGGCGAAC-3'); на интрон 1 гена *EDA* (F5'-GTGGGATGTTGGAGGAAC-3'; R5'-TGCGAACTTTGGTGAAGAAGC-3') у пробанда и его родителей (Синтол, Россия).

Праймеры были подобраны с использованием ресурса Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Выбранные варианты праймеров протестированы на наличие шпилек, само- и гетеродимеров с помощью инструмента OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Статус инактивации X-хромосомы определяли на основе амплификации высокополиморфного CAG-повтора в первом экзоне гена рецептора андрогена (*AR*, Xq12) после гидролиза ДНК метил-чувствительной эндонуклеазой рестрикции HpaII. Продукты ПЦР разделяли с помощью фрагментного анализа. Степень инактивации менее 80 % расценивали как равновероятный характер инактивации, тогда как степень инактивации более 80 % рассматривали как признак смещенной (асимметричной) инактивации X-хромосомы (sXCI) (Allen et al., 1992).

## Результаты

**Клинический случай.** Мальчик, 14 лет, обследован в Генетической клинике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ с подозрением на диагноз «ангидротическая экто-

дермальная дисплазия». Из анамнеза известно, что с рождения у ребенка выявлено отсутствие потоотделения, нарушена терморегуляция. В возрасте двух месяцев был поставлен на диспансерный учет с диагнозом «атопический дерматит, волнообразное течение заболевания». В течение последующих лет ребенок регулярно проходил госпитализацию с острыми аллергическими состояниями: атопические дерматиты, крапивница. В возрасте 8 месяцев прорезались первые зубы: конической формы (шило-видные).

Впервые диагноз «синдром Криста–Сименса–Турена, X-сцепленный рецессивный тип наследования» выставлен в возрасте 1 год и 5 месяцев после консультации врача-генетика на основании клинической картины.

В возрасте 2 лет перенес фимоз с развитием синехий. В возрасте 6 лет пробанд был госпитализирован в хирургический стационар с диагнозом: острый баланопостит, синехии крайней плоти. С возраста 7 лет наблюдается у невролога с диагнозом: невроз навязчивых движений, моторный локализованный тик с вовлечением параорбитальной мускулатуры.

На осмотре у врача-генетика в возрасте 14 лет отмечены следующие фенотипические особенности: гиподонтия верхней челюсти с конусообразными зубами, адонтия нижней челюсти, гипотрихоз, периорбитальная гиперпигментация, ладонно-подошвенный кератоз. Пациент был направлен на молекулярно-генетическое подтверждение диагноза.

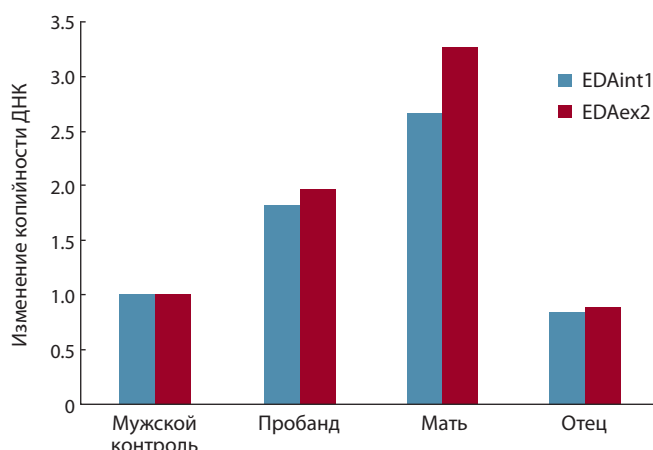
По результатам проведенного полногеномного секвенирования у пробанда были получены данные в пользу наличия дупликации участка хромосомы X с приблизительно границами chrX:69620777-70018072 и размером ~397.3 Kb, которая охватывает один морбинный ген (*EDA*), в гемизиготном состоянии (рис. 1).

С помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) была подтверждена микродупликация Xq13.1 у пробанда и его матери (рис. 2).

У родителей пробанда не отмечено клинических проявлений заболевания. Анализ статуса инактивации X-хромосомы у матери пробанда продемонстрировал равновероятную инактивацию X-хромосомы (74/26 %).



Рис. 1. NGS анализ пробанда (IGV browser).



**Рис. 2.** Анализ копийности участка Xq13.1 у пробанда и его родителей. Результаты Real-time PCR (интрон 1 и экзон 2 гена *EDA*).

## Обсуждение

Ген *EDA* состоит из 419 т. п. н., содержит 8 экзонов и кодирует белок эктодисплазин-А, который является сигнальным лигандом семейства фактора некроза опухоли (TNF) и осуществляет ключевую функцию в формировании эктодермальных структур во время эмбриогенеза. Функция эктодисплазина-А заключается в передаче положительного сигнала для поддержания жизнедеятельности, роста и специализации клеток при взаимодействии с эпителиальной и мезенхимальной тканями и формировании волосных фолликулов (Laurikkala et al., 2002).

По литературным данным, гипогидротическая эктодермальная дисплазия часто сопровождается развитием atopических заболеваний, таких как atopический дерматит, аллергический ринит и бронхиальная астма (Stein, 2007). Это можно объяснить нарушением барьерной функции кожи и слизистых оболочек, что приводит к ксерозу (сухости кожи), а также нарушению терморегуляции, вызванному поражением потовых желез. Отмечается также дисфункция бронхиальных желез, что может приводить к частым респираторным инфекциям и бронхитам. В нашем клиническом случае у пациента с первых месяцев жизни отмечались проявления atopического дерматита, что требовало оказания медицинской помощи.

Клинические проявления у пробанда укладываются в общепринятую клиническую картину Х-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии (Itin, Fistarol, 2004), при этом симптоматика также сходна с ранее описанными в литературе случаями, связанными с патогенными CNV: делециями (Пациент-1, Пациент-2) и дупликацией (Пациент-3), затрагивающими ген *EDA* (см. таблицу).

Согласно литературным данным и базам данных, описано три случая внутригенных CNV, два из которых представляют собой микроделеции и один случай микродупликации. Все они описаны у пациентов с выраженной клинической картиной специфического фенотипа заболевания.

В случае Пациент-1 (Hayashi et al., 2013) описана перестройка NC\_000023.11(NM\_001399.5):c.397-1589\_502+13848del, представляющая собой делецию региона Xq13.1 с координатами chrX:69955438-69970980, которая включает экзон 2 гена *EDA*. В случае Пациент-2 (Li et al., 2008) описана внутригенная делеция 22 п. н. в экзоне 8 гена *EDA*, приводящая к сдвигу рамки считывания. В случае Пациент-3 (Al Marzouqi et al., 2014) описана внутригенная дупликация, затрагивающая экзон 2 гена *EDA*. В базе данных Decipher зарегистрирована также дупликация с близкими координатами, классифицированная как патогенная (Patient:289747) (рис. 3).

Структурные варианты с похожими координатами не встречаются в базах данных популяционных частот GnomAD CNVs/SVs v4.1.0.

По критериям ACMG, разработанным для оценки патогенности CNV, такая перестройка является патогенной (1 балл: 1A, 2A, 3A) (Riggs et al., 2020). Согласно уточненным критериям ACMG/AMP, адаптированным для оценки моногенных CNV, данная перестройка также классифицируется как патогенная (PVS1, PM2, PP4) (Brandt et al., 2020).

Известно, что Х-сцепленная гипогидротическая эктодермальная дисплазия может демонстрировать неполную пенетрантность у женщин-носительниц за счет Х-сцепленного рецессивного типа наследования (Munoz et al., 1997; Cambiaghi et al., 2000). Обнаруженный вариант унаследован от матери – гетерозиготной бессимптомной носительницы. Клиническое проявление Х-сцепленных рецессивных заболеваний у женщин может отсутствовать по причине гетерозиготного состояния Х-хромосомы и равновероятной инактивации Х-хромосомы (Vincent et al., 2001). При смещении инактивации Х-хромосомы у женщин-носительниц могут быть отмечены клинические симптомы, если активным остается гомолог с патогенным вариантом. Нами выявлена равновероятная инактивация Х-хромосомы у матери пробанда, что объясняет отсутствие клинических проявлений заболевания. Оценка клинической значимости данной перестройки в совокупности с критериями патогенности и литературными данными позволяет классифицировать данную перестройку как патогенную.

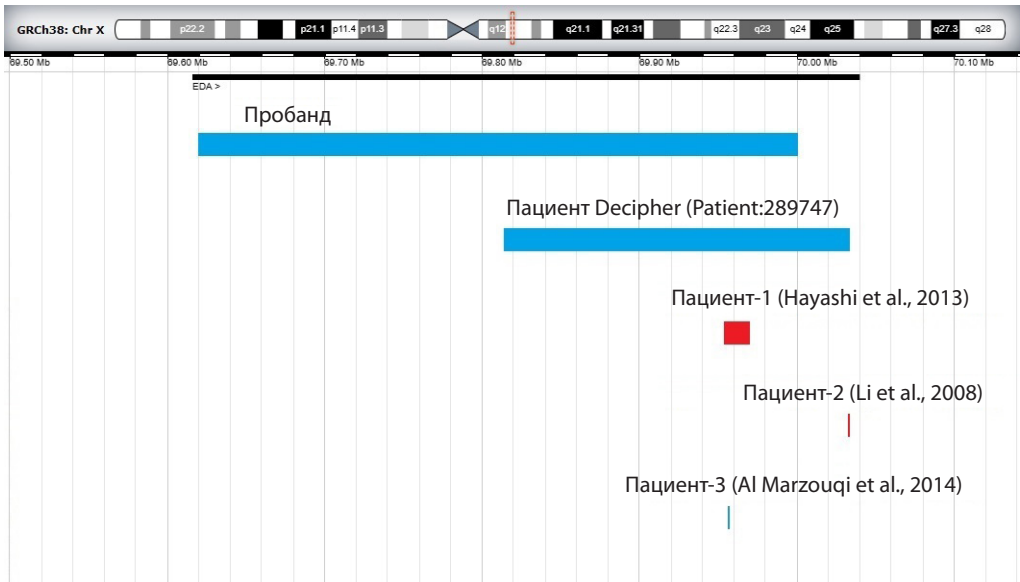
Важнейший аспект представленного клинического случая – использование метода полногеномного секвенирования в диагностике, так как верифицировать внутригенную микродупликацию на Х-хромосоме у мужчин методом NGS (секвенирование гена или полноэкзомное секвенирование) крайне затруднительно. Гемизиготное состояние Х-хромосомы в совокупности с увеличением копийности определенного участка может рассматриваться как большее покрытие гена, что, в свою очередь, может привести к ложноотрицательной диагностике. Кроме того, методы, использующие определение количества копий ДНК, такие как MLPA, aCGH или Real-time PCR, для рутинной диагностики синдрома Криста–Сименса–Турена не используются, так как до 90 % случаев патогенные варианты представлены различными SNV.



Сравнение клинических признаков пробанда с данными литературы

| Клинический признак                                                                  | Пробанд | Пациент-1 <sup>a</sup> | Пациент-2 <sup>b</sup> | Пациент-3 <sup>c</sup> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Изменения кожи                                                                       |         |                        |                        |                        |
| Поверхностное сухое шелушение кожи при рождении                                      | +       | N/A                    | +                      | +                      |
| Сухая и часто гипопигментированная кожа                                              | +       | N/A                    | +                      | +                      |
| Дерматит, напоминающий атопическое заболевание кожи                                  | +       | N/A                    | –                      | –                      |
| Нарушение функции потовых желез                                                      |         |                        |                        |                        |
| Отсутствие или снижение потоотделения                                                | +       | +                      | +                      | +                      |
| Гипертермия в теплых условиях                                                        | +       | +                      | +                      | +                      |
| Аномалии волосяных фолликулов                                                        |         |                        |                        |                        |
| Редкие, выщипавшиеся и светлые волосы                                                | +       | +                      | +                      | +                      |
| Алопеция из-за гипотрихоза или повышенной ломкости волос                             | +       | +                      | +                      | +                      |
| Отсутствие/редкость или деформация бровей или ресниц                                 | +       | +                      | +                      | +                      |
| Изменения ногтей                                                                     |         |                        |                        |                        |
| Лейконихия                                                                           | –       | –                      | –                      | –                      |
| Дистрофические и деформированные ногти                                               | –       | –                      | –                      | –                      |
| Изменения зубов                                                                      |         |                        |                        |                        |
| Гипо- или анодонтия                                                                  | +       | N/A                    | +                      | +                      |
| Деформированные зубы конусообразной или колышковидной формы                          | +       | N/A                    | +                      | +                      |
| Склонность к кариесу из-за дефекта эмали или дисфункции слюнных желез с ксеростомией | +       | N/A                    | N/A                    | +                      |
| Изменения лица                                                                       |         |                        |                        |                        |
| Дисморфические черты                                                                 | –       | +                      | +                      | –                      |
| Многочисленные лицевые мальформации                                                  | –       | +                      | +                      | –                      |
| Аномалии глаз                                                                        |         |                        |                        |                        |
| Дисплазия роговицы                                                                   | –       | –                      | –                      | –                      |
| Катаракта                                                                            | –       | –                      | –                      | –                      |
| Смещение или стеноз слезных точек                                                    | –       | –                      | –                      | –                      |
| Дефектное или сниженное слезоотделение                                               | –       | –                      | –                      | –                      |

Примечание. Данные: <sup>a</sup> (Hayashi et al., 2013), <sup>b</sup> (Li et al., 2008), <sup>c</sup> (Al Marzouqi et al., 2014); N/A – нет данных.



**Рис. 3.** Схематическое масштабированное представление перестроек у ранее описанных пациентов с дупликациями (синие полосы), делециями (красные полосы) и пробанда в гене *EDA*.

## Заключение

Таким образом, представленный нами клинический случай X-сцепленной гипогидротической эктодермальной дисплазии вызван ранее не описанной дупликацией хромосомного региона Xq13.1 с примерными границами chrX:69620777-70018072 и размером ~397.3 Kb, затрагивающей ген *EDA*. Диагноз заболевания был установлен на основании характерной клинической картины. Подтверждение молекулярно-генетическими методами позволило уточнить этиологию и выявить носительство у бессимптомной матери с равновероятной инактивацией X-хромосомы. Это открывает возможности для преко-нцепционной и пренатальной диагностики будущих беременностей в этой семье, учитывая потенциальную возможность передачи заболевания от женщин-носительниц.

## Список литературы / References

- Al Marzouqi F., Michot C., Dos Santos S., Bonnefont J.P., Bodemer C., Hadj-Rabia S. Bilateral amastia in a female with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Br J Dermatol*. 2014;171(3):671-673. doi 10.1111/bjd.13023
- Allen R.C., Zoghbi H.Y., Moseley A.B., Rosenblatt H.M., Belmont J.W. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1229-1239
- Anbouba G.M., Carmany E.P., Natoli J.L. The characterization of hypodontia, hypohidrosis, and hypotrichosis associated with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: A systematic review. *Am J Med Genet A*. 2020;182(4):831-841. doi 10.1002/ajmg.a.61493
- Bagdey S.P., Moharil R.B., Dive A., Bodhade A. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: A case report with review and latest updates. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2022;26(Suppl. 1):S12-S16. doi 10.4103/jomfp.jomfp\_287\_21
- Brandt T., Sack L.M., Arjona D., Tan D., Mei H., Cui H., Gao H., ... Vincent L.M., Reavey C., Lai A., Richard G., Meck J.M. Adapting ACMG/AMP sequence variant classification guidelines for single-gene copy number variants. *Genet Med*. 2020;22(2):336-344. doi 10.1038/s41436-019-0655-2
- Cambiaghi S., Restano L., Pääkkönen K., Caputo R., Kere J. Clinical findings in mosaic carriers of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dermatol*. 2000;136(2):217-224. doi 10.1001/archderm.136.2.217
- Cañueto J., Zafra-Cobo M.I., Ciria S., Unamuno P., González-Sarmiento R. A novel *EDA* gene mutation in a Spanish family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102(9):722-725. doi 10.1016/j.ad.2011.04.004
- Cluzeau C., Hadj-Rabia S., Jambou M., Mansour S., Guigue P., Mas-moudi S., Bal E., ... de Prost Y., Munnich A., Bonnefont J.P., Bodemer C., Smahi A. Only four genes (*EDA1*, *EDAR*, *EDARADD*, and *WNT10A*) account for 90 % of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat*. 2011;32(1):70-72. doi 10.1002/humu.21384
- Hayashi R., Farooq M., Fujikawa H., Fujimoto A., Hashimoto T., Ito M., Shimomura Y. Case of hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by a large deletion mutation in the *EDA* gene. *J Dermatol*. 2013;40(4):281-283. doi 10.1111/1346-8138.12077
- Itin P.H., Fistarol S.K. Ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004;131C(1):45-51. doi 10.1002/ajmg.c.30033
- Kere J., Srivastava A.K., Montonen O., Zonana J., Thomas N., Ferguson B., Munoz F., ... Chen E.Y., Ezer S., Saarialho-Kere U., de la Chapelle A., Schlessinger D. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet*. 1996;13(4):409-416. doi 10.1038/ng0895-409
- Lamartine J. Towards a new classification of ectodermal dysplasias. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(4):351-355. doi 10.1046/j.1365-2230.2003.01319.x
- Laurikkala J., Pispä J., Jung H.S., Nieminen P., Mikkola M., Wang X., Saarialho-Kere U., Galceran J., Grosschedl R., Thesleff I. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development*. 2002;129(10):2541-2553. doi 10.1242/dev.129.10.2541
- Li M., Xu T.Y., Yang L.J., Zhu X.H. A novel 22-bp deletion mutation in a Chinese family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dermatol Res*. 2008;300(7):389-391. doi 10.1007/s00403-008-0855-0
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernysky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-1303. doi 10.1101/GR.107524.110
- Mikkola M.L., Thesleff I. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(3-4):211-224. doi 10.1016/s1359-6101(03)00020-0
- Munoz F., Lestringant G., Sybert V., Frydman M., Alswaini A., Fros-sard P.M., Jorgenson R., Zonana J. Definitive evidence for an autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia clinically indistinguishable from the more common X-linked disorder. *Am J Hum Genet*. 1997;61(1):94-100. doi 10.1086/513905
- Nguyen-Nielsen M., Skovbo S., Svaneby D., Pedersen L., Fryzek J. The prevalence of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) in Denmark, 1995-2010. *Eur J Med Genet*. 2013;56(5):236-242. doi 10.1016/j.ejmg.2013.01.012
- Riggs E.R., Andersen E.F., Cherry A.M., Kantarci S., Kearney H., Patel A., Raca G., Ritter D.I., South S.T., Thorland E.C., Pineda-Alvarez D., Aradhya S., Martin C.L. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*. 2020;22(2):245-257. doi 10.1038/s41436-019-0686-8
- Stein R.A. Smith's recognizable patterns of human malformation, 6th edition. *Arch Dis Child*. 2007;92(6):562
- Vincent M.C., Biancalana V., Ginisty D., Mandel J.L., Calvas P. Mutational spectrum of the ED1 gene in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(5):355-363. doi 10.1038/sj.ejhg.5200635
- Visinoni A.F., Lisboa-Costa T., Pagnan N.A., Chautard-Freire-Maia E.A. Ectodermal dysplasias: clinical and molecular review. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(9):1980-2002. doi 10.1002/ajmg.a.32864
- Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):e164. doi 10.1093/nar/gkq603
- Wohlfart S., Meiller R., Hammersen J., Park J., Menzel-Severing J., Melichar V.O., Huttner K., Johnson R., Porte F., Schneider H. Natural history of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: a 5-year follow-up study. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):7. doi 10.1186/s13023-019-1288-x

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.03.2026. После доработки 01.06.2026. Принята к публикации 02.06.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-96

# Генетический анализ представителя воинской знати из могильника черняховской культуры Дальний (Выдрин) в Курской области

Е.В. Рождественских <sup>1</sup>, Т.В. Андреева <sup>1, 2, 3</sup>, С.С. Кунижева <sup>1, 2</sup>, А.Д. Манахов <sup>1, 2</sup>, М.С. Гашева <sup>1</sup>,  
О.А. Радюш <sup>4</sup>, И.К. Решетова <sup>4</sup>, М.В. Добровольская <sup>4</sup>, Е.И. Рогаев <sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр генетики и генетических технологий, биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт археологии Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>5</sup> Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, США

andreeva@rogaevlab.ru; evivrecc@gmail.com

**Аннотация.** В позднеримский период на территории Восточной Европы происходит обострение военно-политической обстановки как на границе Рима (Римской империи) и Барбарикума, так и внутри них. Значительную роль в динамике этих процессов играла черняховская культурная общность, формирование которой, согласно историко-археологическим данным, происходило при активном участии германских племен, продвинувшихся в этот регион с Северо-Запада Европы, причерноморского оседлого и отчасти степного кочевого населения. Погребальный обряд черняховской культуры предполагает крайне редкое помещение оружия, предположительно, только в могилы представителей воинской знати. В связи с чем антропологический материал из подобных погребений является ценным объектом для археогенетических исследований, позволяющим понять генетическое происхождение представителей воинской элиты черняховского общества. В данной работе мы впервые представляем результаты полногеномного анализа представителя воинской элиты из статусного захоронения черняховской культуры на могильнике Дальний (Выдрин), расположенного на северной границе ареала черняховской культуры. Совокупность археологических данных и проведенного ранее антропологического анализа указывает на то, что погребенный индивид принадлежал к воинской знати периода позднечерняховской культуры, который датируется концом IV в. н.э. С использованием масштабного параллельного секвенирования были определены полногеномные последовательности этого индивида. Показана принадлежность индивида к мужскому полу. Анализ однородительских маркеров свидетельствует о европейском происхождении материнской и отцовской линий исследованного мужчины. На основе анализа аутомных маркеров мы впервые продемонстрировали генетическую связь этого индивида, представляющего воинское сословие черняховской культуры, с представителями кочевых степных групп: скифов, сарматов и авар. Полученные результаты вносят вклад в понимание сложной картины межэтнических контактов, лежавших в основе формирования населения полиэтнической черняховской общности.

**Ключевые слова:** черняховская культура; позднеримское время; древняя ДНК; кочевники; археогенетика

**Для цитирования:** Рождественских Е.В., Андреева Т.В., Кунижева С.С., Манахов А.Д., Гашева М.С., Радюш О.А., Решетова И.К., Добровольская М.В., Рогаев Е.И. Генетический анализ представителя воинской знати из могильника черняховской культуры Дальний (Выдрин) в Курской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(6):955-963. doi 10.18699/vjgb-26-96

**Финансирование.** Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус», соглашение № 18–03 от 10.09.2024 (ЕВР, ТВА, АДМ, МСГ).

## Genetic analysis of a representative of the military nobility from the Dal'niy (Vydrin) burial ground of the Chernyakhov culture in the Kursk region

E.V. Rozhdestvenskikh <sup>1</sup>, T.V. Andreeva <sup>1, 2, 3</sup>, S.S. Kunizheva <sup>1, 2</sup>, A.D. Manakhov <sup>1, 2</sup>, M.S. Gasheva <sup>1</sup>,  
O.A. Radyush <sup>4</sup>, I.K. Reshetova <sup>4</sup>, M.V. Dobrovolskaya <sup>4</sup>, E.I. Rogayev <sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, Russia

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Centre of Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute of Archaeology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>5</sup> UMass Chan Medical School, Department of Psychiatry, Shrewsbury, USA

andreeva@rogaevlab.ru; evivrecc@gmail.com



**Abstract.** During the late Roman period, the military and political conditions in Eastern Europe declined both along the frontier between the Roman Empire and Barbaricum and within those territories. The Chernyakhov culture played an important role in the dynamics of these events. According to historical and archaeological evidence, this society was formed by Germanic tribes that had moved into the region from northwestern Europe, as well as a nomadic population of the steppes. The Chernyakhov culture's funerary traditions included the placement of weapons, most likely solely in the graves of military nobles. In this context, human remains from these burials serve as a unique resource for archaeogenetic studies, enabling insights into the genetic origins of the military aristocracy within the Chernyakhov culture. In this paper, we present the results of a whole-genome analysis of a member of the military elite from a status burial of the Chernyakhov culture at the Dal'niy (Vydrin) burial ground, located on the northern border of the Chernyakhov culture area. According to archaeological data and previous anthropological analysis, the buried individual belonged to the military nobility of the late Chernyakhov culture, which lasted from the fourth to fifth centuries AD. The whole-genome sequences of this individual were generated by large-scale parallel sequencing. The individual was shown to be male. Analysis of haplogroup markers indicated the European origin of maternal and paternal lineages. The examination of autosomal markers clearly indicated a genetic link between this individual, associated with the warrior class of the Chernyakhov culture, and members of nomadic steppe groups, specifically the Scythians, Sarmatians, and Avars. The results contribute to our understanding of the complex picture of interethnic contacts that created the basis for the formation of the polyethnic Chernyakhov culture.

**Key words:** Chernyakhov culture; late Roman period; ancient DNA; nomads; archaeogenetics

**For citation:** Rozhdestvenskikh E.V., Andreeva T.V., Kunizheva S.S., Manakhov A.D., Gasheva M.S., Radyush O.A., Reshetova I.K., Dobrovolskaya M.V., Rogaev E.I. Genetic analysis of a representative of the military nobility from the Dal'niy (Vydrin) burial ground of the Chernyakhov culture in the Kursk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):955-963. doi 10.18699/vjgb-26-96

## Введение

В позднеримский исторический период (II–V вв. н. э.) на границах Европы и Великой степи происходили значительные изменения. В этот период на обширной территории за пределами границ Римской империи (территории Барбарикума) наблюдались масштабные миграции, военно-политические кризисы и формирование новых культурных сообществ (Хитер, 2011). Одной из наиболее значительных среди них является черняховская культурно-историческая общность (середина III–начало V в. н. э.), занимавшая обширные территории от Нижнего Дуная до Северского Донца и Курского Посемья. Археологические исследования подтверждают, что черняховская культура сформировалась в результате сложного полиэтнического процесса, включавшего миграцию германских племен из Северо-Западной Европы, а также их взаимодействие с местным населением, проживавшим в лесной и лесостепной зонах (Терпиловский, 2000; Обломский, 2002; Радюш, 2018, 2023). Данные антропологии показывают также возможность наличия генетической связи черняховского социума с населением степных районов, представленным популяциями скифо-сарматского круга (скифы, сарматы, аланы) (Рудич, 2006, 2010).

Несмотря на относительное единообразие материальной культуры, погребальный обряд черняховского общества позволял четко определить социальную иерархию. Захоронения с оружием встречаются крайне редко и, согласно общепринятому в археологии мнению, относятся к представителям воинской аристократии (Радюш, 2012, 2019; Радюш, Васильев, 2022). Таким образом, антропологический материал из таких захоронений представляет собой уникальный источник для изучения генетического облика и происхождения представителей воинской элиты черняховского общества, игравшей ключевую роль в военно-политических процессах эпохи Великого переселения народов.

В 2021 г. в ходе археологических раскопок на могильнике черняховской культуры Дальний (Выдрин) в верховьях реки Суджи в Курской области было обнаружено уникальное по богатству инвентаря захоронение мужчины в возрасте 35–40 лет (Радюш, Васильев, 2022; Радюш и др., 2025). Погребение, датируемое концом IV в., содержало большое количество керамических сосудов высокого качества, в том числе массивную чернолощеную вазу и кувшин, а также стеклянный кубок, пряжки и фибулу. В изголовье был обнаружен клинок длиной около 40 см. Благодаря хорошей сохранности органических материалов удалось установить, что оружие находилось в деревянных ножнах и было изготовлено из дамасской стали. С учетом традиции черняховского погребального обряда индивид был отнесен к представителям воинской знати, что подтверждается данными антропологического анализа, выявившего комплекс физических признаков, характерных для опытного всадника, регулярно подвергавшегося физическим и воинским нагрузкам (Радюш и др., 2025). Данное захоронение является уникальным для памятников черняховской культуры левобережья Днепра, а его расположение вблизи так называемого Княжеского погребения у деревни Большой Каменец в Курской области подчеркивает высокий статус погребенного мужчины (Радюш, Васильев, 2022).

Несмотря на то что в исторической науке традиционно признается полиэтничность черняховской общности, вопрос о происхождении ее воинской элиты, особенно в периферийных регионах левобережного днепровского ареала, остается дискуссионным. Археогенетические исследования предоставляют инструмент для проверки исторических и археологических гипотез на уровне генетического изучения отдельных индивидов.

В рамках данного исследования впервые представлены результаты полногеномного анализа представителя воин-

ской аристократии черняховской культуры, из погребения на могильнике Дальний (Выдрин), расположенном в Большесолдатском районе Курской области.

## Материалы и методы

Выделение древней ДНК (дДНК) проводили в специальных помещениях, предназначенных для работы с древним материалом на базе АНОО ВО «Университет “Сириус”». Молекулярно-генетические работы выполняли в соответствии с ранее разработанными методиками (Gansauge, Meyer, 2013; Andreeva et al., 2022). В качестве источника дДНК использовали костный порошок, полученный из корня зуба индивида из захоронения 12 с территории могильника Дальний (Выдрин). Для исследуемого образца (далее обозначен Dch08), были приготовлены две геномные библиотеки: из нативной ДНК и ДНК, обработанной смесью ферментов PreCR Repair Mix (NEB) для восстановления постмортальных модификаций (Mouttham et al., 2015). Секвенирование проводили на платформах Illumina MiSeq и Illumina NovaSeq 6000 в режиме одноконцевых прочтений (56 нукл.).

Полученные в результате секвенирования исходные данные были проанализированы с использованием биоинформатического конвейера, включающего программы FastQC, AdapterRemoval v2, mapDamage v2, BWA, SAMtools, BCFtools, BEDTools, BamUtil (Li et al., 2009; Schubert et al., 2012, 2016; Jónsson et al., 2013; Picard Tools – By Broad Institute, 2019; Danecsek et al., 2021). Прочтения после удаления адаптерных последовательностей были картированы на референсную последовательность митохондриального генома человека (мтДНК, NC\_012920.1), а также на референсный геном человека (сборка GRCh37). Уровень контаминации исследуемой дДНК оценивали двумя методами: расчетом гетерозиготности митохондриального генома с использованием программы Schmutzi (Renaud et al., 2015) и анализом полиморфизмов X-хромосомы с помощью программы ANGSD (Rasmussen et al., 2011). Определение генетического пола исследуемого индивида осуществляли с помощью метода karyo\_RxRy (Anastasiadou et al., 2024).

Последовательность митохондриального генома была реконструирована на основе BAM-файла. Определение гаплогруппы выполнено в HaploGrep 3 (PhyloTree build 17) (Schönherr et al., 2023) с последующим уточнением по YFull MTre 1.02 (YFull, 2025). Филогеографический анализ проводили с использованием последовательностей современных и древних образцов из баз NCBI (отобраны с помощью BLAST при Query cover = 100 % и Percent Identity 99.95 %), AmnDB (Ehler et al., 2019). Построение филогенетического дерева выполняли с помощью программы mtPhyl (Eltsov, Volodko, 2016) с исключением позиций с высокой частотой мутаций.

Для определения гаплогруппы Y-хромосомы использовали программу yhaplo (Poznik, 2016). Для подтверждения Y-гаплогруппы проводили проверку выявленных однонуклеотидных вариантов с помощью данных ISOGG Y-DNA Haplogroup Tree 2019–2020 (International Society..., 2024;

<https://isogg.org/tree/index.html>) и YFull YTree v.11.01.00 (YFull, 2025).

Для проведения популяционного анализа был создан набор псевдогаплоидных генотипов для маркеров панели «1240k» (Mathieson et al., 2015). Для получения генотипов использованы samtools mpileup, а также опция --randomHaploid из пакета pileupCaller (Schiffels, 2025). В анализ были включены индивиды, датируемые периодом от 6050 г. до н.э. до 1326 г. н.э., из базы данных AADR, при этом использовали только генотипы, полученные на основе данных полногеномного секвенирования. Дополнительно в выборку вошли геномные данные ранее опубликованных образцов черняховской культуры и индивидов, связанных со скифо-сарматским кругом (Andreeva et al., 2025; Saag et al., 2025; Schütz et al., 2025). Образцы с выявленными родственными связями, а также для которых определены генотипы менее чем по 10 тыс. маркеров, были исключены из анализа.

Для проведения анализа методом главных компонент (PCA) отобранные древние образцы были объединены с современными образцами из панели Human Origins (HO), содержащей ~600 тыс. генетических маркеров (Lazaridis et al., 2014). Из полученного файла были отфильтрованы транзиции и варианты с низкой частотой минорного аллеля (--maf 0.01), а также варианты с высокой долей пропущенных генотипов (--geno 0.95). Расчет главных компонент выполняли с использованием модуля smartpca пакета EIGENSOFT v.6.1.4 (Patterson et al., 2006). Древние образцы были визуализированы на графике PCA путем их проекции на пространство главных компонент, полученного на основе современных популяций.

Для проведения анализа ADMIXTURE набор данных был дополнен популяциями с максимизированными генетическими компонентами. Из полученного файла с помощью биоинформатического пакета PLINK 1.9 (Chang et al., 2015) были удалены транзиции, варианты с низкой частотой минорного аллеля, а также генетически сцепленные варианты с указанием параметра “--indep-pairwise 200 5 0.5”. Для определения оптимального числа генетических компонент (K) выполнено 10 независимых запусков ADMIXTURE для каждого значения K от 2 до 20 с расчетом ошибки перекрестной проверкой (--cv). В качестве оптимального выбрано значение K, соответствующее наименьшему значению CV error.

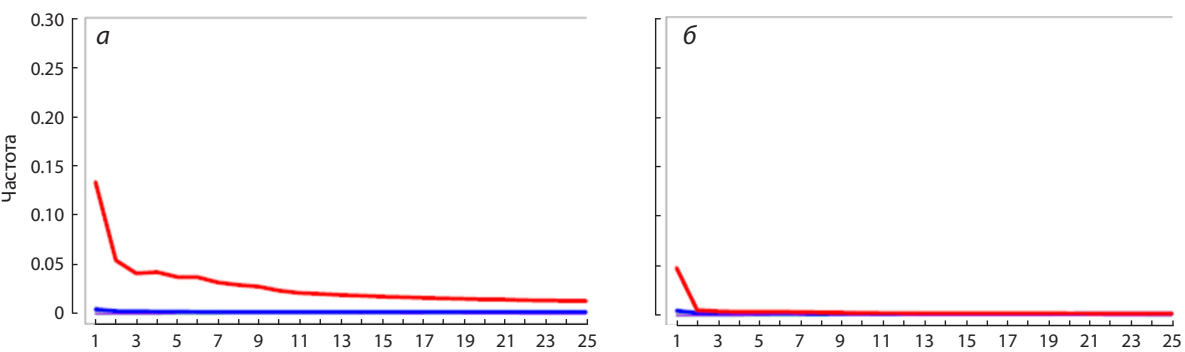
## Результаты и обсуждение

В результате секвенирования ДНК, выделенной из костного порошка образца Dch08, и последующего картирования последовательностей на референсные геномы получено среднее геномное покрытие ~1x и > 100x для среднего покрытия мтДНК (см. таблицу). На концах прочтений выявлена повышенная частота замен цитозина на тимин, что подтверждает аутентичность дДНК (рис. 1). Генетический пол индивида определен как мужской (XY). Уровень контаминации не превышал 4 %.

Митохондриальная последовательность индивида принадлежит к гаплогруппе U5a1 и содержит дополнительно

Сводная статистика для полученных геномных данных образца Dch08

| Количество полученных прочтений | Доля прочтений, картированных на геном человека (GRCh37) | Среднее покрытие генома (GRCh37) | Среднее покрытие митохондриального генома человека (NC_012920) | Уровень контаминации по мтДНК (Schmutzi) | Уровень контаминации по X-хромосоме (ANGSD) |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 241 112 513                     | 41.31 %                                                  | x0.9                             | x118.1                                                         | 4 %                                      | 0.42 %                                      |

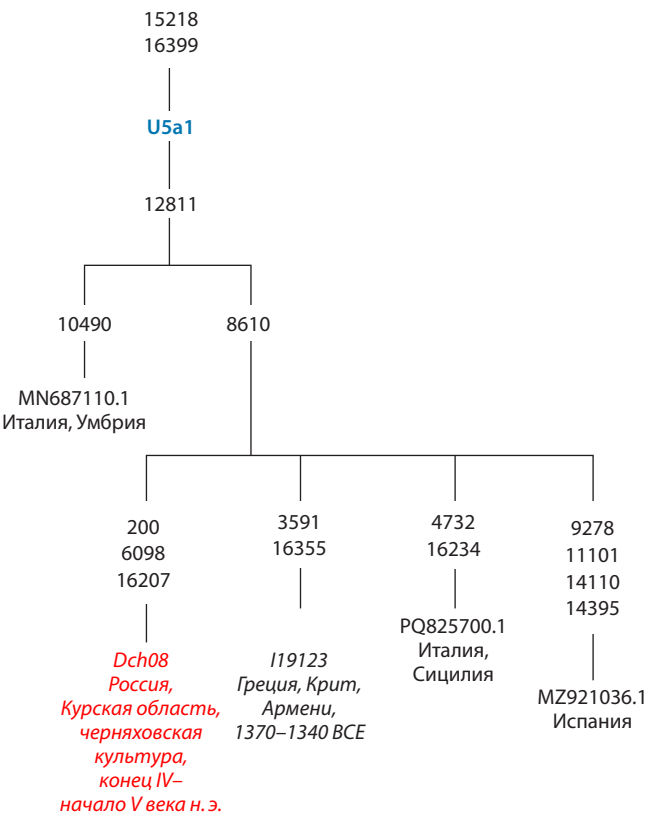


**Рис. 1.** Профиль замен цитозина на тимин (красная кривая) в прочтениях, картированных на референсный геном человека GRCh37.  
Результаты, полученные для геномной библиотеки, приготовленной: а – из нативной ДНК; б – из репарированной ДНК.

ные варианты в позициях 12811 и 8610, по которым он кластеризуется вместе с индивидом из позднеминойского некрополя Армени (о. Крит, Греция, 1370–1340 гг. до н. э.) (Lazaridis et al., 2017) и современными жителями Испании и Италии (рис. 2). При этом митогеном образца Dch08 относится к уникальной ветви в рамках гаплогруппы U5a1, его отличают специфические варианты в позициях 200, 6098, 16207, не встречающиеся у древних и современных представителей данной клады.

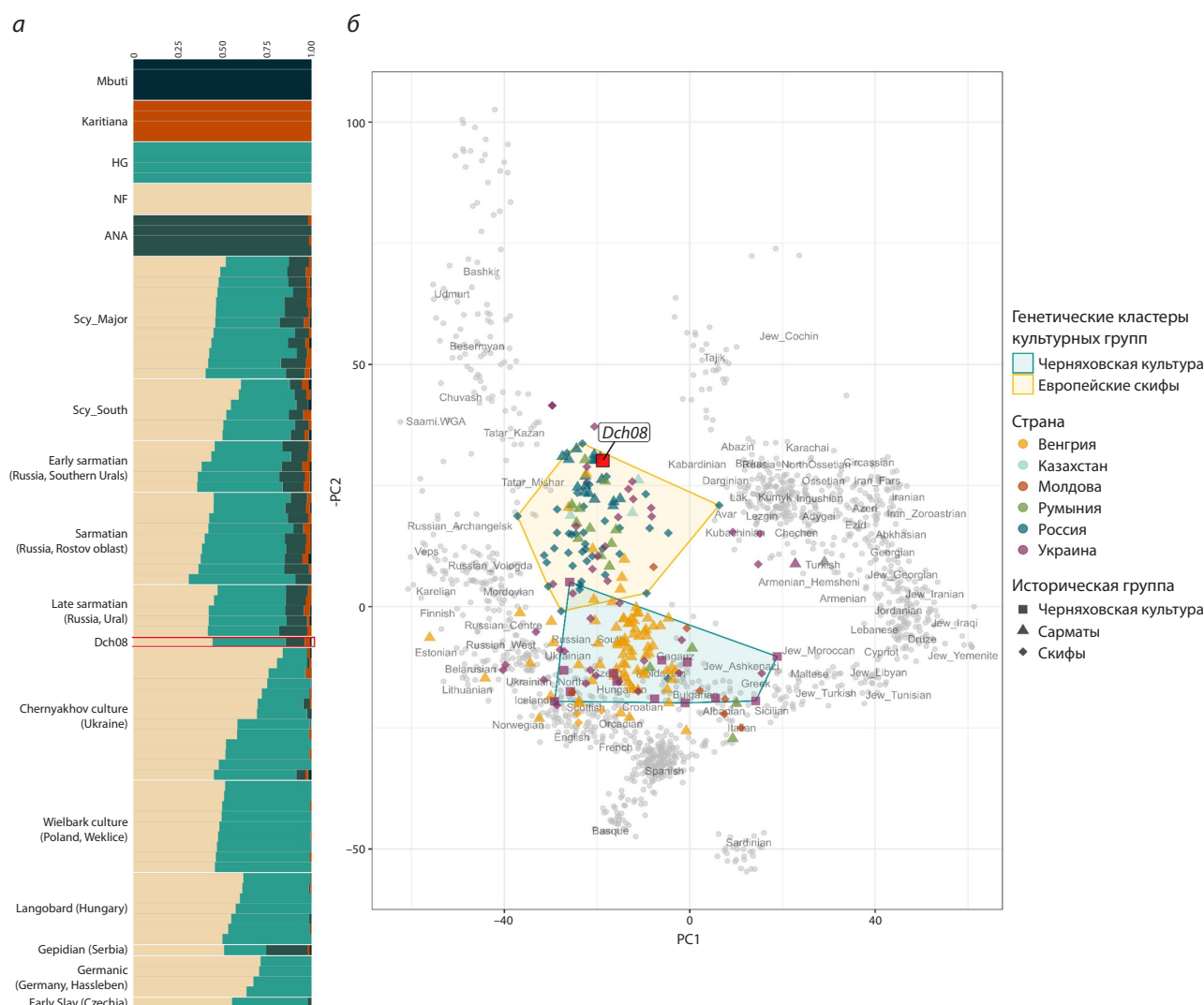
Гаплогруппа U5a1 выделилась 15.4 тыс. лет назад (согласно данным Yfull) и была обнаружена у представителей мезолитического населения Северной и Восточной Европы (Skoglund et al., 2014; Mathieson et al., 2015, 2018; Günther et al., 2018; Allentoft et al., 2024), у представителей поздненеолитических культур шнуровой керамики и колоколовидных кубков (Linderholm et al., 2020), также у индивидов из таких культур бронзового века, как срубная (Krzewińska et al., 2018; Mathieson et al., 2018) и минойская (Lazaridis et al., 2017), у индивидов железного века из Италии (Emery et al., 2018), Польши (Stolarek et al., 2023), у сарматов с территории Казахстана (Damgaard et al., 2018). В настоящее время эта линия встречается среди жителей Италии, Испании и на территории России (в частности, в отдельных популяциях Северного Кавказа), что указывает на ее широкое распространение в Западной Евразии.

У-хромосомный гаплотип индивида Dch08 принадлежит к гаплогруппе R1a1a1b1 (R1a-Z283), маркеры, характерные для более глубоких субклад, не обнаружены. Данная линия образовалась предположительно 5–6 тыс. лет назад, и ее широкое распространение на территории Европы связывают с экспансией носителей культуры шнуровой керамики (Haak et al., 2008; Underhill et al., 2010; Saag et



**Рис. 2.** Фрагмент филогенетического дерева гаплогруппы U5a1.  
Цифрами обозначены позиции, в которых выявлены однонуклеотидные замены. Для каждого образца указано географическое/этническое происхождение, для древних образцов дополнительно указана датировка. Исследуемый образец Dch08 обозначен красным цветом. Древние образцы выделены курсивом.





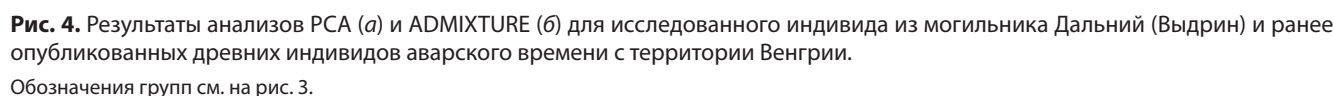
**Рис. 3.** Результаты анализов ADMIXTURE (а) и PCA (б) для исследованного индивида из могильника Дальний (Выдрин) и ранее опубликованных древних индивидов.

Наименование древних групп представлено в соответствии с базой данных AADR (Mallick et al., 2024) и публикациями (Andreeva et al., 2025; Saag et al., 2025). NF (Neolithic Farmers) – Austria\_N\_LBK.SG, Turkey\_Marmara\_Barcin\_N.SG, Germany\_Saxony\_LBK\_N.SG; ANA (Ancient north asian) – Mongolia\_Xiongnu.SG, Russia\_DevilsCave\_N.SG; HG (Hunter-gatherers) – Italy\_Epigraevettian.SG, Russia\_Mesolithic\_Veretye.SG.

al., 2019); древнейшие образцы предковой гаплогруппы R1a обнаружены в могильнике Элау (Восточная Германия, ~2600 г. до н. э.) и у представителей той же культуры на территории Эстонии (2702 г. до н. э.) (Haak et al., 2008; Saag et al., 2019). В более поздний период, включая раннее Средневековье, носители гаплогруппы R1a-Z283 найдены в Скандинавии и других европейских регионах (McColl et al., 2024).

По данным электронной базы FamilyTreeDNA (<https://www.familytreedna.com/public/y-dna-haploree/R>), этот субклад наиболее распространен в современных европейских популяциях, преимущественно Польши (14.37 %), Швеции (11.62 %) и России (10.72 %). Полученный результат свидетельствует о генетической преемственности образца Dch08 по мужской линии от популяций, которые сформировались на территории Европы в эпоху позднего неолита.

Результаты анализов главных компонент и ADMIXTURE исследуемого образца Dch08 показывают отличие генетического профиля от ранее исследованных индивидов черняховской культуры с территории памятников Легедзин, Шишаки, Золочив и Комаров-1 (Järve et al., 2019; Saag et al., 2025) (рис. 3). Исследуемый образец на графике PCA попадает в кластер образцов кочевников раннего железного века (скифов и сарматов), а также демонстрирует сходство с ними по результатам анализа ADMIXTURE. Ранее проведенные анализ археологических материалов, происходящих с памятников черняховской культуры, а также краниологический анализ ее представителей свидетельствуют о вероятном присутствии в составе данной культурной общности незначительной доли индивидов, генетически связанных с популяциями скифо-сарматского круга, в восточных и южных частях ареала (Нижнее По-



Согласно историческим и археологическим данным, предполагается, что в формировании черняховской культурной общности, вероятно, принимали участие переселенцы с территории Северной Европы, представленные племенами готов и близкими им гегидами, герулами, а также, возможно, другие восточногерманские группировки (Седов, 1979; Магомедов, 2001; Шукин, 2005). На основе проведенного анализа мы не выявили сходства Dch08 ни с одной из рассматриваемых групп, для которых на момент

написания статьи были доступны полногеномные данные. В частности, не обнаружено связи с носителями вельбаркской культуры (Stolarek et al., 2023; Antonio et al., 2024), лангобардов (Amorim et al., 2018), гепидов (Veeramah et al., 2018) (см. рис. 3). Сочетание однородительских маркеров западноевразийского происхождения (Y: R1a-Z283; мтДНК: U5a1) и аутосомного профиля, более характерного для представителей кочевых групп (скифов, сарматов и авар), указывает на возможное происхождение индивида Dch08 из популяции, испытавшей генетическое влияние со стороны кочевников.

В результате проведенного полногеномного исследования индивида из могильника Дальний (Выдрин) впервые установлена генетическая связь между представителем воинской элиты черняховской культуры и кочевым населением степей первой половины I тысячелетия н. э. Известно, что развитие комплекса вооружения у племен, населявших лесостепные территории Восточной Европы в первой половине I тысячелетия нашей эры, в частности у представителей черняховской культуры, в значительной

степени обусловлено влиянием Центральной Европы и Римской империи. Влияние кочевых народов степей на этот процесс было менее выраженным. Однако к концу времени существования черняховской культуры, к периоду, к которому относится могильник Дальний (Выдрин), это влияние стало играть значимую роль (Радюш, 2023), что подтверждают обнаруженные нами степные компоненты в генетическом профиле индивида, относящегося к позднему периоду черняховской культуры.

Настоящее исследование расширяет базу источников для реконструкции механизмов этногенеза и социальной стратификации населения Восточной Европы в предгуннское и гуннское время, демонстрируя продуктивность интеграции палеогенетических, археологических и нарративных данных.

## Список литературы / References

- Магомедов Б.В. Черняховская культура. Проблема этноса. Lublin, 2001;140-143. Доступно: [http://archaeology.ru/Download/Magomedov/Magomedov\\_2001\\_Czerniachov\\_ethnos.pdf](http://archaeology.ru/Download/Magomedov/Magomedov_2001_Czerniachov_ethnos.pdf) [Magomedov B.V. Chernyakhov Culture. The Problem of Ethnicity. Lublin, 2001;140-143. Available: [http://archaeology.ru/Download/Magomedov/Magomedov\\_2001\\_Czerniachov\\_ethnos.pdf](http://archaeology.ru/Download/Magomedov/Magomedov_2001_Czerniachov_ethnos.pdf) (in Russian)]
- Обломский А.М. Днепровское лесостепное Левобережье в поздне-римское и гуннское время (середина III–первая половина V в. н.э.). М.: Наука, 2002 [Oblomskiy A.M. The Forest-steppe Dnieper Left Bank Area in the Late Roman and Hun Ages (Middle III–first Half of V Centuries A.D.). Moscow: Nauka Publ., 2002 (in Russian)]
- Радюш О.А. Вооружение III–V вв. н.э. с черняховских поселений Курского Посемья. *Stratum Plus. Археология и культурная антропология*. 2012;4:139-155 [Radyush O.A. Armament of 3rd–5th centuries AD from Chernyakhov culture settlements from the Sejma river basin in the Kursk region. *Stratum Plus. Archaeol Cultural Anthropol*. 2012;4:139-155 (in Russian)]
- Радюш О.А. Черняховская и киевская культуры: соотношение и проблемы в интерпретации памятников на востоке днепровского левобережья. В: Ранний железный век Евразии от рубежа эр до середины I тыс. н.э. Динамика освоения культурного пространства. СПб.: Скифия-принт, 2018;119-125 [Radyush O.A. The Chernyakhov and Kiev cultures: correlations and problems in the interpretation of artifacts in the eastern Dnieper left bank area. In: Early Iron Age in Eurasia from the Turn of Eras to the Middle 1st Millennium A.D.: Dynamics of Cultural Arena Expansion. St. Petersburg: Skifiya-Print Publ., 2018;119-125 (in Russian)]
- Радюш О.А. Престижное вооружение и доспех V–VI вв. на востоке раннеславянского мира. В: Балканы, Подунавье и Восточная Европа в римское время и в раннем средневековье. Нови-Сад, 2019;261-288 [Radyush O.A. Top-quality weapon and armor in the eastern Early Slavic world in the 5th–6th centuries. In: Balkans, Danube Region, and Eastern Europe in the Roman and Early Middle Ages. Novi-Sad, 2019;261-288 (in Russian)]
- Радюш О.А. «Сарматские» элементы в вооружении черняховской культуры? (Некоторые дискуссионные вопросы в изучении оружия поздне-римского времени и начала эпохи переселения народов в Восточной Европе). *Нижневольтский археологический вестник*. 2023;22(2):126-166. doi 10.15688/nav.jvolsu.2023.2.7 [Radyush O.A. “Sarmatian” elements in the armament of the Chernyakhov culture? (Some controversial issues in the study of weapons of the late Roman period and the beginning of the migration era of peoples in Eastern Europe). *Nizhnevolzhskii Arkheologicheskii Vestnik* = *Lower Volga Archaeological Bulletin*. 2023;22(2):126-166. doi 10.15688/nav.jvolsu.2023.2.7 (in Russian)]
- Радюш О.А., Васильев А.А. Погребение с оружием на могильнике черняховской культуры Дальний (Выдрин) в Курской области. *Нижневольтский археологический вестник*. 2022;208-242. doi 10.15688/nav.jvolsu.2022.2.13 [Radyush O.A., Vasil'ev A.A. Burial with weapons at the burial ground of the Chernyakhov culture Dal'niy (Vydrin) in the Kursk region. *Nizhnevolzhskii Arkheologicheskii Vestnik* = *Lower Volga Archaeological Bulletin*. 2022;21(2):208-242. doi 10.15688/nav.jvolsu.2022.2.13 (in Russian)]
- Радюш О.А., Решетова И.К., Рассказова А.В. Междисциплинарные исследования материалов черняховской культуры IV в. из могильника Дальний (Выдрин) в верховьях реки Суджа. *Stratum Plus. Археология и культурная антропология*. 2025;4:171-220. doi 10.55086/sp254171220 [Radyush O.A., Reshetova I.K., Rasskazova A.V. Interdisciplinary research of Chernyakhov culture materials of the 4th century AD from the Dal'niy (Vydrin) burial ground in the upper reaches of the Sudzha river. *Stratum Plus. Archaeol Cultural Anthropol*. 2025;4:171-220. doi 10.55086/sp254171220 (in Russian)]
- Рудич Т.А. Сарматы в составе черняховской культуры (по материалам антропологии). В: Готы и Рим. Киев: Библиотека Vita Antiqua, 2006;73-86 [Rudich T.A. Sarmatians in the Chernyakhov culture according to anthropological data. In: The Goths and Rome. Kiev, Biblioteka Vita Antiqua Publ., 2006;73-86 (in Russian)]
- Рудич Т.А. Население черняховской культуры Дунайско-Днестровского междуречья по материалам антропологии. *Stratum Plus. Археология и культурная антропология*. 2010;4:223-231 [Rudich T.A. Chernyakhov culture population on the territories between the Danube and Dniester rivers according to the anthropological data. *Stratum Plus. Archaeol Cultural Anthropol*. 2010;4:223-231 (in Russian)]
- Рудич Т.О. Населения Среднего Подніпров'я I–II тисячоліття за матеріалами антропології. Київ: Майдан, 2014 [Rudich T.O. Inhabitants of the Middle Dnieper Region in the 1st and 2nd Millennia According to Anthropological Data. Kyiv: Maidan Publ., 2014 (in Ukrainian)]
- Седов В.В. Происхождение и ранняя история славян. М.: Наука, 1979 [Sedov V.V. The Origin and Early History of Slavs. Moscow: Nauka Publ., 1979 (in Russian)]
- Терпиловский Р.В. Киевская и черняховская культуры. Проблема контактов. *Stratum Plus. Археология и культурная антропология*. 2000;4:303-311 [Terpilovskii R.V. Kiev and Chernyakhov cultures: the problem of contacts. *Stratum Plus. Archaeol Cultural Anthropol*. 2000;4:303-311 (in Russian)]
- Хитер П. Падение Римской империи. Новая история Рима и варваров. М.: АСТ, 2011 [Heather P. The Fall of the Roman Empire: a New History of Rome and the Barbarians. Oxford: Oxford University Press, 2005]
- Шукин М.Б. Готский путь (готы, Рим и черняховская культура). СПб., 2005 [Shchukin M.B. The Gothic Way (Goths, Rome and the Culture of Chernyakhov). Saint-Petersburg, 2005 (in Russian)]
- Allentoft M.E., Sikora M., Refoyo-Martínez A., Irving-Pease E.K., Fischer A., Barrie W., Ingason A., ... Delaneau O., Werge T., Racimo F., Kristiansen K., Willerslev E. Population genomics of post-glacial western Eurasia. *Nature*. 2024;625(7994):301-311. doi 10.1038/s41586-023-06865-0
- Amorim C.E.G., Vai S., Posth C., Modi A., Koncz I., Hakenbeck S., La Rocca M.C., ... Barbujani G., Krause J., Caramelli D., Geary P.J., Veeramah K.R. Understanding 6th-century barbarian social organization and migration through paleogenomics. *Nat Commun*. 2018; 9(1):3547. doi 10.1038/s41467-018-06024-4



- Anastasiadou K., Silva M., Booth T., Speidel L., Audsley T., Barrington C., Buckberry J., ... Holst M., Loe L., Armit I., Schulting R., Skoglund P. Detection of chromosomal aneuploidy in ancient genomes. *Commun Biol.* 2024;7:14. doi 10.1038/s42003-023-05642-z
- Andreeva T.V., Manakhov A.D., Gusev F.E., Patrikeev A.D., Golovanova L.V., Doronichev V.B., Shirobokov I.G., Rogaev E.I. Genomic analysis of a novel Neanderthal from Mezmaiskaya Cave provides insights into the genetic relationships of Middle Palaeolithic populations. *Sci Rep.* 2022;12(1):13016. doi 10.1038/s41598-022-16164-9
- Andreeva T.V., Soshkina A.D., Gusev F.E., Malyarchuk A.B., Dotsenko G.S., Dudko N.A., Plotnikova M.Yu., ... Kantorovich A.R., Maslov V.E., Barinov D.G., Dobrovolskaya M.V., Rogaev E.I. Genetic history of Scythia. *Sci Adv.* 2025;11(30):eads8179. doi 10.1126/sciadv.ads8179
- Antonio M.L., Weiß C.L., Gao Z., Sawyer S., Oberreiter V., Moots H.M., Spence J.P., ... Borić D., Novak M., Coppa A., Pinhasi R., Pritchard J.K. Stable population structure in Europe since the Iron Age, despite high mobility. *eLife.* 2024;13:e79714. doi 10.7554/eLife.79714
- Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C., Vattikuti S., Purcell S.M., Lee J.J. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience.* 2015;4(1):7. doi 10.1186/s13742-015-0047-8
- Damgaard P.B., Marchi N., Rasmussen S., Peyrot M., Renaud G., Korneliussen T., Moreno-Mayar J.V., ... Nielsen R., Sikora M., Heyer E., Kristiansen K., Willerslev E. 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature.* 2018;557(7705):369-374. doi 10.1038/s41586-018-0094-2
- Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M.O., Whitwham A., Keane T., McCarthy S.A., Davies R.M., Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience.* 2021;10(2):giab008. doi 10.1093/gigascience/giab008
- Ehler E., Novotný J., Juras A., Chyleński M., Moravčík O., Pačes J. AmdtDB: a database of ancient human mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D29-D32. doi 10.1093/nar/gky843
- Eltsov N., Volodko N. MtPhyl: Software tool for human mtDNA analysis and phylogeny reconstruction. 2016
- Emery M.V., Duggan A.T., Murchie T.J., Stark R.J., Klunk J., Hider J., Eaton K., Karpinski E., Schwarcz H.P., Poinar H.N., Prowse T.L. Ancient Roman mitochondrial genomes and isotopes reveal relationships and geographic origins at the local and pan-Mediterranean scales. *J Archaeol Sci Rep.* 2018;20:200-209. doi 10.1016/j.jasrep.2018.04.036
- Gansauge M.-T., Meyer M. Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. *Nat Protoc.* 2013;8(4):737-748. doi 10.1038/nprot.2013.038
- Günther T., Malmström H., Svensson E.M., Omrak A., Sánchez-Quinto F., Kılınc G.M., Krzewińska M., ... Lidén K., Skar B., Storå J., Götherström A., Jakobsson M. Population genomics of Mesolithic Scandinavia: investigating early postglacial migration routes and high-latitude adaptation. *PLoS Biol.* 2018;16(1):e2003703. doi 10.1371/journal.pbio.2003703
- Haak W., Brandt G., de Jong H.N., Meyer C., Ganslmeier R., Heyd V., Hawkesworth C., Pike A.W.G., Meller H., Alt K.W. Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(47):18226-18231. doi 10.1073/pnas.0807592105
- International Society of Genetic Genealogy (ISOGG v15.73). 2024. URL: <https://isogg.org/tree/index.html> (accessed 12.24.2025)
- Järve M., Saag L., Scheib C.L., Pathak A.K., Montinaro F., Pagani L., Flores R., ... Metspalu M., Savelev N., Kriiska A., Kivisild T., Villems R. Shifts in the genetic landscape of the Western Eurasian Steppe associated with the beginning and end of the Scythian dominance. *Curr Biol.* 2019;29(14):2430-2441.e10. doi 10.1016/j.cub.2019.06.019
- Jónsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L.F., Orlando L. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics.* 2013;29(13):1682-1684. doi 10.1093/bioinformatics/btt193
- Krzewińska M., Kılınc G.M., Juras A., Koptekin D., Chyleński M., Nikitin A.G., Shcherbakov N., ... Dalén L., Sinika V., Jakobsson M., Storå J., Götherström A. Ancient genomes suggest the eastern Pontic-Caspian steppe as the source of western Iron Age nomads. *Sci Adv.* 2018;4(10):eaat4457. doi 10.1126/sciadv.aat4457
- Lazaridis I., Patterson N., Mittnik A., Renaud G., Mallick S., Kirsanow K., Sudmant P.H., ... Slatkin M., Pääbo S., Kelso J., Reich D., Krause J. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature.* 2014;513(7518):409-413. doi 10.1038/nature13673
- Lazaridis I., Mittnik A., Patterson N., Mallick S., Rohland N., Pflengle S., Furtwängler A., ... Stockhammer P., Pinhasi R., Reich D., Krause J., Stamatoyannopoulos G. Genetic origins of the Minoans and Mycenaeans. *Nature.* 2017;548(7666):214-218. doi 10.1038/nature23310
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079. doi 10.1093/bioinformatics/btp352
- Linderholm A., Kılınc G.M., Szczepanek A., Włodarczak P., Jarosz P., Belka Z., Dopieralska J., ... Koman W., Rodríguez-Varela R., Storå J., Götherström A., Krzewińska M. Corded Ware cultural complexity uncovered using genomic and isotopic analysis from south-eastern Poland. *Sci Rep.* 2020;10(1):6885. doi 10.1038/s41598-020-63138-w
- Mallick S., Micco A., Mah M., Ringbauer H., Lazaridis I., Olalde I., Patterson N., Reich D. The Allen Ancient DNA Resource (AADR) a curated compendium of ancient human genomes. *Sci Data.* 2024;11(1):182. doi 10.1038/s41597-024-03031-7
- Maróti Z., Neparáczki E., Schütz O., Maár K., Varga G.I.B., Kovács B., Kalmár T., ... Gulyás B., Kovácsóczy B.N., Gál S.S., Tomka P., Török T. The genetic origin of Huns, Avars, and conquering Hungarians. *Curr Biol.* 2022;32(13):2858-2870.e7. doi 10.1016/j.cub.2022.04.093
- Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N., Mallick S., Patterson N., Roodenberg S.A., Harney E., ... Anthony D., Lalueza-Fox C., Haak W., Pinhasi R., Reich D. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature.* 2015;528(7583):499-503. doi 10.1038/nature16152
- Mathieson I., Alpaslan-Roodenberg S., Posth C., Szécsényi-Nagy A., Rohland N., Mallick S., Olalde I., ... Borić D., Bonsall C., Krause J., Pinhasi R., Reich D. The genomic history of southeastern Europe. *Nature.* 2018;555(7695):197-203. doi 10.1038/nature25778
- McColl H., Kroonen G., Moreno-Mayar J.V., Seersholm F.V., Scorrano G., Pinotti T., Vimala T., ... Nielsen R., Hedeager L., Kristiansen K., Sikora M., Willerslev E. Steppe ancestry in Western Eurasia and the spread of the Germanic languages. *bioRxiv.* 2024. doi 10.1101/2024.03.13.584607
- Moutham N., Klunk J., Kuch M., Fournery R., Poinar H. Surveying the repair of ancient DNA from bones via high-throughput sequencing. *BioTechniques.* 2015;59(1):19-25. doi 10.2144/000114307
- Patterson N., Price A.L., Reich D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2006;2(12):e190. doi 10.1371/journal.pgen.0020190
- Picard Tools – By Broad Institute [WWW Document]. 2019. URL <https://broadinstitute.github.io/picard/> (accessed 12.1.2025)
- Poznik G.D. Identifying Y-chromosome haplogroups in arbitrarily large samples of sequenced or genotyped men. *bioRxiv.* 2016. doi 10.1101/088716
- Rasmussen M., Guo X., Wang Y., Lohmueller K.E., Rasmussen S., Albrechtsen A., Skotte L., ... Sicheritz-Pontén T., Villems R., Nielsen R., Wang J., Willerslev E. An Aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia. *Science.* 2011;334(6052):94-98. doi 10.1126/science.1211177

- Renaud G., Slon V., Duggan A.T., Kelso J. Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biol.* 2015;16:224. doi 10.1186/s13059-015-0776-0
- Saag L., Laneman M., Varul L., Malve M., Valk H., Razzak M.A., Shirobokov I.G., ... Kivisild T., Villems R., Lang V., Metspalu M., Tambets K. The arrival of Siberian ancestry connecting the Eastern Baltic to Uralic speakers further east. *Curr Biol.* 2019;29(10):1701-1711. e16. doi 10.1016/j.cub.2019.04.026
- Saag L., Utevska O., Zadnikov S., Shramko I., Gorbenko K., Bandrivskiy M., Pavliv D., ... Barrington C., Gilardet A., Macleod R., Skoglund P., Thomas M.G. North Pontic crossroads: mobility in Ukraine from the Bronze Age to the early modern period. *Sci Adv.* 2025;11(2):eadr0695. doi 10.1126/sciadv.adr0695
- Schiffels S. stschiff/sequenceTools. 2025
- Schönherr S., Weissensteiner H., Kronenberg F., Forer L. Haplogrep 3 – an interactive haplogroup classification and analysis platform. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(W1):W263-W268. doi 10.1093/nar/gkad284
- Schubert M., Ginolhac A., Lindgreen S., Thompson J.F., Al-Rasheid K.A., Willerslev E., Krogh A., Orlando L. Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC Genomics.* 2012;13:178. doi 10.1186/1471-2164-13-178
- Schubert M., Lindgreen S., Orlando L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res Notes.* 2016;9:88. doi 10.1186/s13104-016-1900-2
- Schütz O., Maróti Z., Tihanyi B., Kiss A.P., Nyerki E., Gînguță A., Kiss P., ... Soficaru A.D., Spekker O., Varga S., Neparáczki E., Török T. Unveiling the origins and genetic makeup of the “forgotten people”: a study of the Sarmatian-period population in the Carpathian Basin. *Cell.* 2025;188(15):4074-4090.e11. doi 10.1016/j.cell.2025.05.009
- Skoglund P., Malmström H., Omrak A., Raghavan M., Valdiosera C., Günther T., Hall P., ... Apel J., Willerslev E., Storå J., Götherström A., Jakobsson M. Genomic diversity and admixture differs for stone-age Scandinavian foragers and farmers. *Science.* 2014;344(6185):747-750. doi 10.1126/science.1253448
- Stolarek I., Zenczak M., Handschuh L., Juras A., Marcinkowska-Swojak M., Spinek A., Dębski A., Matla M., Kóčka-Krenz H., Piontek J.; Polish Archaeogenomics Consortium Team; Figlerowicz M. Genetic history of East-Central Europe in the first millennium CE. *Genome Biol.* 2023;24(1):173. doi 10.1186/s13059-023-03013-9
- Underhill P.A., Myres N.M., Rootsi S., Metspalu M., Zhivotovsky L.A., King R.J., Lin A.A., ... Majumder P., Rudan P., Primorac D., Villems R., Kivisild T. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(4):479-484. doi 10.1038/ejhg.2009.194
- Veeramah K.R., Rott A., Groß M., Van Dorp L., López S., Kirsanow K., Sell C., ... Pfüffgen B., Hellenthal G., Haas-Gebhard B., Harbeck M., Burger J. Population genomic analysis of elongated skulls reveals extensive female-biased immigration in Early Medieval Bavaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(13):3494-3499. doi 10.1073/pnas.1719880115
- YFull [WWW Document]. 2025. URL <https://www.yfull.com/> (accessed 12.1.2025)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.12.2025. После доработки 29.12.2025. Принята к публикации 29.12.2025.

doi 10.18699/vjgb-26-97

# Обнаружение болезней земляники садовой с помощью БПЛА на основе сегментации мультиспектральных изображений методами глубокого машинного обучения

А.Ф. Чешкова , В.С. Риксен  , О.В. Елкин

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

 riksenvs@sfscs.ru

**Аннотация.** Точная и своевременная диагностика болезней земляники садовой является важной задачей, позволяющей минимизировать потери урожая и снизить затраты на обработку растений. Использование беспилотных летательных аппаратов (БПЛА) с мультиспектральными камерами открывает новые возможности для неинвазивного мониторинга состояния растений. Цель настоящего исследования – анализ возможности выявления заболеваний земляники садовой (на примере белой пятнистости, возбудитель *Ramularia tulasnei* Sacc.) по мультиспектральным изображениям, полученным с БПЛА, с использованием методов глубокого машинного обучения. Съемка опытного участка (37×22 м) проводилась квадрокоптером DJI Phantom 4 Multispectral на высоте 3 м (разрешение 2.2 мм/пиксель). Полученные данные прошли предварительную обработку, включая построение ортофотоплана в программе Agisoft Metashape Pro и ручное выделение областей интереса (ROI) в ENVI 5.2. Сформирован набор из 360 мультиспектральных изображений размером 64×64×5 (каналы 450, 560, 650, 730, 840 нм) с тремя классами: здоровые растения, больные растения и почва. На данном наборе была обучена модель архитектуры U-Net (с модулями attention gate, squeeze-and-excitation и residual connections). Дополнительно для оценки вклада мультиспектральных каналов обучены U-Net модель на RGB-изображениях, а также классическая модель Random Forest на основе 40 текстовых признаков GLCM. Модель U-Net, обученная на мультиспектральных данных, достигла общей точности классификации 96.04 %, что существенно выше показателей Random Forest (76.64 %) и U-Net на RGB-изображениях (94.14 %). Полученные карты распространения болезни позволяют проводить точечное применение фунгицидов. Предложенный подход подтвердил эффективность глубокого обучения для диагностики белой пятнистости земляники. Дальнейшие исследования будут направлены на расширение набора данных (разные сорта и стадии болезней), апробацию более современных архитектур сегментации и масштабирование метода на промышленные плантации.

**Ключевые слова:** земляника садовая; белая пятнистость; БПЛА; мультиспектральная съемка; глубокое обучение; U-Net; семантическая сегментация; точное земледелие

**Для цитирования:** Чешкова А.Ф., Риксен В.С., Елкин О.В. Обнаружение болезней земляники садовой с помощью БПЛА на основе сегментации мультиспектральных изображений методами глубокого машинного обучения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2026;30(6):964-972. doi 10.18699/vjgb-26-97

## UAV-based disease detection in strawberry by multispectral image segmentation invoking deep learning

A.F. Cheshkova , V.S. Riksen  , O.V. Elkin

Siberian Federal Scientific Center of AgroBioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

 riksenvs@sfscs.ru

**Abstract.** Accurate and timely diagnosis of strawberry diseases is crucial for minimizing crop loss and reducing the cost of plant treatment. The use of unmanned aerial vehicles (UAVs) equipped with multispectral cameras opens up new possibilities for noninvasive plant health monitoring. The objective of this research is to explore the feasibility of detecting diseases in strawberries through multispectral imagery obtained from UAVs combined with deep learning techniques. Leaf spot disease, caused by *Ramularia tulasnei* Sacc., was chosen as a case study. A DJI Phantom 4 Multispectral quadcopter was used to survey an experimental plot (37×22 m) from an altitude of 3 m, achieving a resolution of 2.2 mm per pixel. Preprocessing of the acquired data involved orthomosaic building using Agisoft Metashape Pro and manual region-of-interest (ROI) extraction in ENVI 5.2. A dataset comprising 360 multispectral images, each of size 64×64×5 (with spectral bands at 450, 560, 650, 730, and 840 nm), was created and separated into three classes: healthy plants, diseased plants, and soil. Using this dataset, a U-Net-based model – supplemented with the attention gate, squeeze-and-excitation, and residual connections modules – was trained. Additionally, to assess the contribution of multispectral channels, another U-Net model was trained on RGB images, as well as a classic Random



Forest model based on 40 GLCM texture features. The U-Net model trained on multispectral data achieved an overall classification accuracy of 96.04 %, which is significantly higher than the performance of Random Forest (76.64 %) and the U-Net on RGB images (94.14 %). The resulting disease distribution maps enable site-specific fungicide application. The proposed approach confirmed the effectiveness of deep learning for diagnosing leaf spot disease in strawberries. Future research will focus on expanding the dataset (different cultivars and disease stages), testing more advanced segmentation architectures, and scaling the method to commercial plantations.

**Key words:** strawberry; leaf spot disease; UAV; multispectral imaging; deep learning; U-Net; semantic segmentation; precision agriculture

**For citation:** Cheshkova A.F., Riksen V.S., Elkin O.V. UAV-based disease detection in strawberry by multispectral image segmentation invoking deep learning. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(6):964-972. doi 10.18699/vjgb-26-97

## Введение

Мониторинг состояния сельскохозяйственных растений с помощью беспилотных летательных аппаратов (БПЛА) – одна из важнейших технологий в современном точном земледелии (Radoglou-Grammatikis et al., 2020). Потенциал БПЛА продемонстрирован в ряде приложений, таких как обнаружение стрессов растений, картографирование полей, оценка биомассы, борьба с сорняками, подсчет популяции растений (Toscano et al., 2024). Повышенная эффективность, стабильность, точность и производительность – преимущества БПЛА, позволяющие фермерам и экспертам принимать более обоснованные и своевременные управленческие решения (Phang et al., 2023).

Благодаря использованию различных видов датчиков, устанавливаемых на БПЛА, стало возможным выявление различных аспектов состояния растений.

Так, изображения в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне позволяют оценивать морфологию отдельных органов или целого растения, динамику роста, накопление биомассы, показатели урожайности, степень поражения вредителями и болезнями (Чешкова, 2022; Zahir et al., 2022). Изображения, полученные с помощью автофлуоресценции хлорофилла, помогают определить общий биоэнергетический статус растения, а также генетическую устойчивость к стрессорам (Moustakas et al., 2021). Съемка в инфракрасном диапазоне используется для определения температуры растений, оценки водного статуса, степени поражения насекомыми (Hou et al., 2022). Лазерное сканирование и 3D-изображения применяются для определения морфологии семян, ориентации листьев, структуры кроны, архитектуры корней, линейных размеров растения (Jin et al., 2021).

Одна из важных и распространенных задач полевого мониторинга – обнаружение заболеваний растений на изображениях, полученных с помощью БПЛА (Neupane, Baysal-Gurel, 2021). Среди датчиков, устанавливаемых на БПЛА, для идентификации заболеваний преимущественно используются мультиспектральные камеры. Спектральная информация изображений, полученных с помощью этих камер, позволяет рассчитать различные вегетационные индексы (ВИ), отражающие биофизические и биохимические свойства растений, которые изменяются в ответ на различные стрессы (Candiago et al., 2015). Данные индексы помогают охарактеризовать эти изменения и представляют собой один из наиболее важных факторов для идентифи-

кации болезней сельскохозяйственных культур (Mahlein et al., 2013).

Применимость мультиспектральных данных не ограничивается вычислением спектральных индексов. Более эффективный и точный способ анализа изображений – использование методов машинного обучения. Данные методы можно условно разделить на две группы.

В классических методах машинного обучения (SVM, Random Forest, KNN) эксперт должен вручную создавать и отбирать признаки из сырых данных (Behmann et al., 2015; Singh et al., 2016). Качество модели сильно зависит от информативности этих признаков. Несмотря на свои достоинства, эти алгоритмы могут быть применены только к табличным данным, что затрудняет их использование для обнаружения заболеваний растений по изображениям или видеоматериалам (Benos et al., 2021).

В методах глубокого машинного обучения (U-Net, SegNet, ResNet) происходит автоматическое извлечение признаков. Нейронная сеть сама находит иерархии признаков, извлекая их из сырых данных (Мударисов, Мифтахов, 2024; Sajitha et al., 2024). Эти методы позволяют обрабатывать изображения и видеоматериалы, чтобы научиться обнаруживать и классифицировать симптомы заболеваний растений (Loey et al., 2020; Nagaraju, Chawla, 2020; Abade et al., 2021).

Основные виды задач, решаемые при анализе изображений с применением методов машинного обучения, – это сегментация, классификация и детекция (Saleem et al., 2019; Ding et al., 2024).

Обнаружение стрессов растений по БПЛА снимкам является задачей семантической сегментации, когда для каждого пикселя на изображении необходимо установить его принадлежность к определенной категории (почва, здоровые или больные растения) и, таким образом, составить карту распространения заболеваний на поле.

Среди ягодных культур земляника садовая (*Fragaria × ananassa*) занимает первое место по производству и потреблению в мире. На ее долю приходится свыше 70 % общемирового производства ягод (Ожерельев и др., 2019). Точная своевременная и неинвазивная диагностика болезней и абиотических стрессов земляники имеет важное значение в ее промышленном производстве, так как позволяет минимизировать потери урожая и снизить затраты на обработку растений (Zheng et al., 2021).

Цель настоящего исследования – анализ возможности выявления заболеваний земляники садовой по мультиспектральным изображениям, полученным с помощью БПЛА, с использованием методов глубокого машинного обучения.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Материалом исследования были растения земляники садовой, выращиваемые в коллекционном питомнике СибФТИ СФНЦА РАН. На участке размером  $37 \times 22$  м находились растения сорта «Фестивальная» трехлетнего возраста. Растения высажены рядами шириной 50 см; расстояние между рядами 70 см. На дату съемки значительная часть растений была поражена заболеванием белая пятнистость (возбудитель *Ramularia tulasnei* Sacc.). С помощью визуального осмотра было отобрано 80 здоровых растений и 80 растений, имеющих видимые симптомы поражения листьев. Отобранные растения были помечены табличками розового и голубого цвета соответственно (рис. 1).

**Получение изображений.** Съемка осуществлялась с помощью квадрокоптера DJI Phantom 4 Multispectral (SZ DJI Technology Co., Ltd., Shenzhen, Китай). Установленная на дроне камера имеет одну матрицу видимого излучения RGB и пять монохромных (синий, зеленый, красный, край красного спектра, ближний инфракрасный), включающих длины волн 450, 560, 650, 730 и 840 нм соответственно.

Съемка проведена 15.07.2025 при пасмурной погоде на высоте 3 м. Разрешение съемки составило 2.2 мм/пиксель. В результате съемки получено 2170 снимков с перекрытием 75 % в продольном и 60 % в поперечном направлениях.

**Предварительная обработка изображений и формирование наборов данных.** Монохромные мультиспектральные камеры снимают каждый спектральный канал отдельным сенсором в разные моменты времени. Из-за движения дрона и вибраций эти каналы не совпадают по пиксельно на сырых кадрах. Перед началом обучения моделей необходимо привязать все спектральные каналы к единой системе координат и создать мультиспектральный растр, где в каждом пикселе присутствуют все нужные длины волн. Без этого этапа нейросеть не сможет корректно извлекать спектральные признаки, так как пиксели разных каналов будут относиться к разным точкам местности.

Первым этапом обработки снимков, полученных с помощью пяти монохромных камер PM4, была сборка единого мультиспектрального изображения (ортофотоплана) опытного участка. Для данной цели использовалась программа Agisoft Metashape Pro (Agisoft LLC, Россия). Результирующее изображение опытного участка было сформировано в формате GeoTIFF с разрешением  $15000 \times 20000 \times 5$ , размером 2.9 Гб.

Второй этап – разметка изображений. На полученном ортофотоплане вручную были выделены параллельные осям прямоугольные области интереса (ROI) размером  $64 \times 64 \times 5$ , содержащие помеченные табличками больные и здоровые растения, а также области почвы (сами таблички в ROI не включали). Из каждой выделенной области был создан отдельный файл изображения (рис. 2). Выделение ROI и формирование изображений выполняли в программе ENVI 5.2 (ITT Visual Information Solutions).

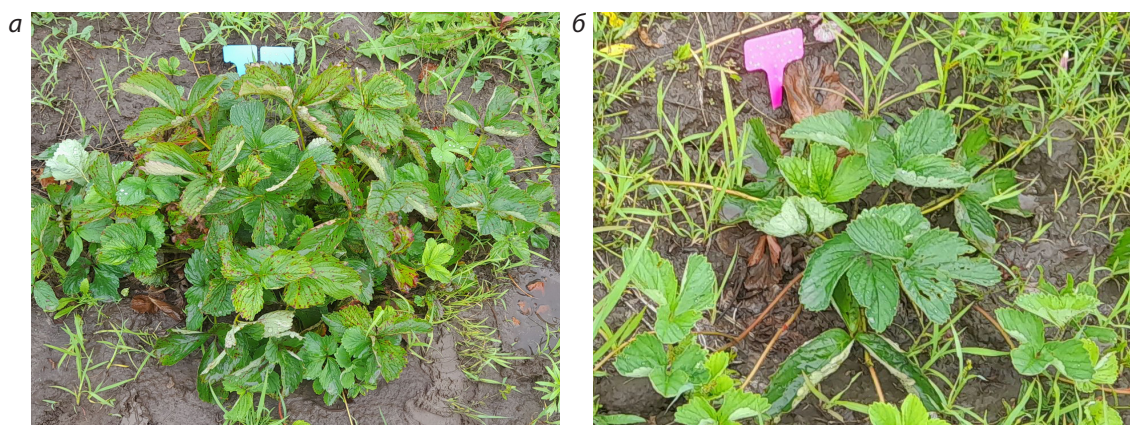
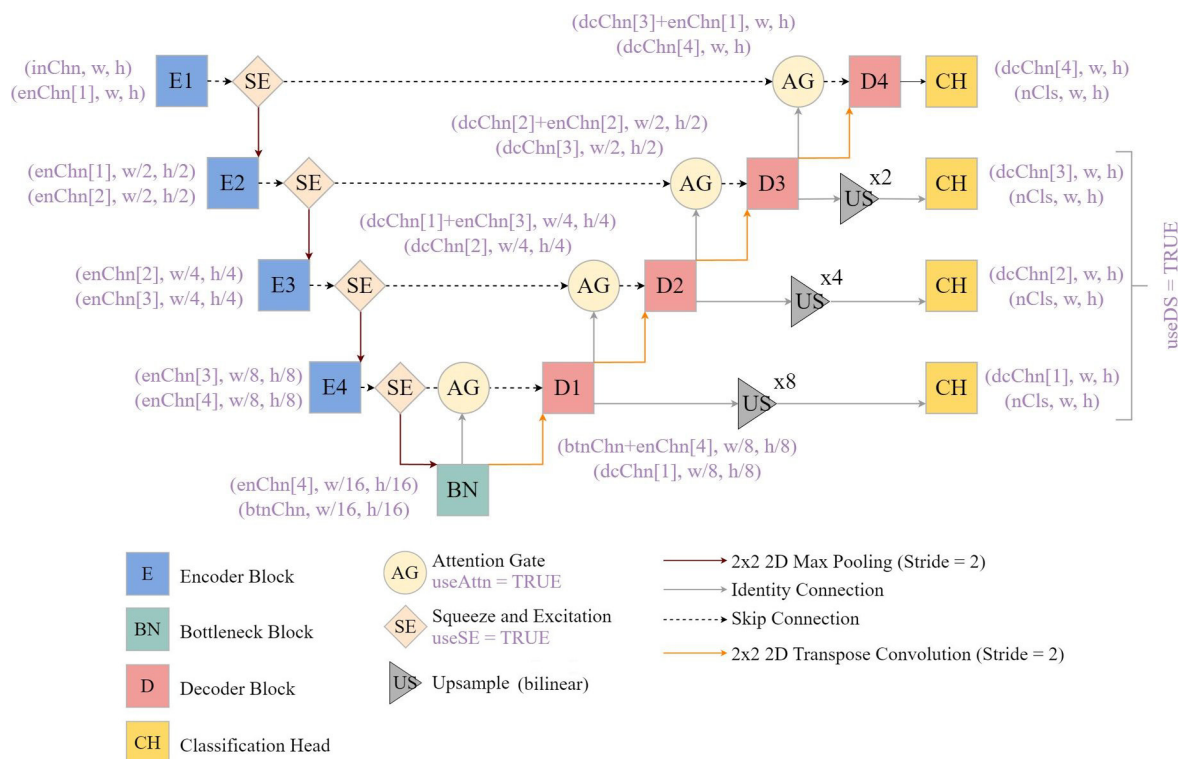


Рис. 1. Растения земляники: а – пораженные белой пятнистостью; б – здоровые.



Рис. 2. Выделенные из изображений области: а – растения, пораженные белой пятнистостью; б – здоровые растения; в – почва.



**Рис. 3.** Архитектура U-Net, реализованная в пакете geodl.

Блоки с префиксом E обозначают блоки энкодера, а блоки с префиксом D – блоки декодера; w – ширина; h – высота.

Таким образом, сформирован набор данных из 360 мультиспектральных изображений (по 120 на каждый класс). Из них 240 – обучающая выборка, 60 – валидационная, 60 – тестовая.

В целях сравнения точности моделей был подготовлен второй набор данных для анализа, составленный из RGB-изображений. Отличие заключалось в том, что ROI выделялись на исходных снимках, полученных с RGB-камеры PM4, без формирования ортофотоплана. Набор данных RGB также содержит 360 изображений размером  $64 \times 64 \times 3$ .

Для сравнения с классическими методами машинного обучения был сформирован дополнительный набор табличных данных по следующему алгоритму. Для каждого мультиспектрального изображения ( $64 \times 64 \times 5$ ) из обучающей выборки отдельно по каждому из пяти монохромных каналов попиксельно методом скользящего окна было рассчитано по восемь текстурных характеристик (среднее, дисперсия, гомогенность, контраст, несходство, энтропия, второй момент, корреляция) на основе матрицы совместной встречаемости уровней серого GLCM (Li et al., 2019; Guo et al., 2021; Zhou et al., 2022).

Был выбран наименьший размер окна ( $3 \times 3$  пикселя). Для пикселей локальной области, выходящей за пределы изображения на крае, значения текстурных характеристик устанавливали в NA (not available). Относительное расстояние, измеренное в пикселях (d) в GLCM, было установлено равным 1 ( $d = 1$ ). Матрицы вычислялись для четырех направлений:  $\Theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ , характери-

сти усреднялись по этим направлениям. Итоговая таблица для каждого изображения содержала  $64 \times 64 = 4096$  строк,  $8 \times 5 = 40$  столбцов текстурных характеристик и столбец класса (здоровый, больной, почва). Далее из этих таблиц случайным образом выбирали по 1000 пикселей, не содержащих NA значения. Таким образом, набор данных для обучения составил 240000 строк (по 80000 в каждом классе). Размер валидационной и тестовой выборки – по 60000 строк.

**Методы моделирования и анализа данных.** Все расчеты и анализ данных проведены в программной среде R с использованием пакетов torch, geodl, randomForest, terra.

В нашем исследовании рассмотрены две модели машинного обучения: модель глубокого обучения U-Net (Ronneberger et al., 2015) и классическая модель Random Forest (Breiman, 2001).

Сверточная нейронная сеть U-Net – одна из наиболее популярных архитектур для решения задач семантической сегментации (Kerkech et al., 2020; Zhang T. et al., 2021). Знаменитая U-образная архитектура сети с сужающимся контуром (кодировщиком) для захвата контекста и симметричным расширяющимся контуром (декодером) для точной локализации, а также «пропускаемые связи» между кодировщиком и декодером позволяют сети объединять высокоуровневые признаки с детальной пространственной информацией, что приводит к созданию высокоточных карт сегментации даже при ограниченном объеме обучающих данных.



Мы использовали архитектуру U-Net, представленную на рис. 3 и реализованную в пакете geodl (Maxwell et al., 2024). Она может принимать переменное количество входных предикторных переменных (т.е. подходит как для RGB, так и для мультиспектральных изображений). Архитектура включает четыре кодирующих блока, один узловой блок и четыре декодирующих блока. Количество выходных карт признаков установлено (16, 32, 64, 128) в кодирующих блоках и (128, 64, 32, 16) в декодирующих блоках. Во всей архитектуре использовали функции активации ReLU для внесения нелинейности, а также применяли пакетную нормализацию для борьбы с проблемами градиентов и ускорения сходимости.

В кодировщике размер массива в пространственных измерениях уменьшается вдвое после каждого блока с помощью операции максимального пулинга  $2 \times 2$  и с шагом 2. В декодировщике используется двумерная транспонированная свертка для удвоения пространственного разрешения карт признаков, полученных от предыдущего блока; так же с шагом 2. Финальные классы предсказываются с помощью двумерной свертки  $1 \times 1$ . К основным блокам архитектуры U-Net были добавлены модули attention gate, squeeze-and-excitation и residual connections.

Классическая модель Random Forest, основанная на использовании ансамбля решающих деревьев, также часто применяется для решения задач дистанционного зондирования, в том числе для обнаружения и классификации болезней растений (Lan et al., 2020; Liao et al., 2022; Zhang S. et al., 2022). На предыдущем этапе исследований мы выяснили, что для решения задачи обнаружения болезней земляники по мультиспектральным снимкам методом Random Forest наилучшие результаты получаются при использовании набора текстурных характеристик в качестве информативных признаков (Чешкова, Риксен, 2025).

**Метрики качества моделей.** Для оценки качества сегментации использовали стандартные критерии, вычисляемые отдельно для каждого класса: Accuracy, Precision, Recall, F1-score и IoU. Их расчет основан на элементах матрицы ошибок:  $TP$  (true positive) – число пикселей рассматриваемого класса, правильно отнесенных моделью к этому классу;  $TN$  (true negative) – число пикселей остальных классов, правильно не отнесенных к рассматриваемому классу;  $FP$  (false positive) – число пикселей других классов, ошибочно отнесенных к рассматриваемому классу;  $FN$  (false negative) – число пикселей рассматриваемого класса, ошибочно отнесенных к другим классам.

Ассурасу (доля правильных классификаций) характеризует долю всех пикселей, классифицированных правильно при оценке конкретного класса по схеме «данный класс – остальные классы». Она учитывает как правильно распознанные пиксели данного класса, так и правильно отнесенные к другим классам пиксели. Чем ближе Ассурасу к 1 (100 %), тем выше правильность классификации.

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}.$$

Precision (точность) показывает, какая доля пикселей, отнесенных моделью к рассматриваемому классу, дей-

ствительно принадлежит к этому классу. Высокое значение Precision соответствует малому числу ложноположительных срабатываний.

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP + FP}.$$

Recall (полнота, чувствительность) характеризует долю пикселей рассматриваемого класса, которые модель правильно обнаружила среди всех пикселей, фактически принадлежащих к этому классу. Высокий Recall означает малое число ложноотрицательных результатов, т.е. пропусков пикселей данного класса.

$$\text{Recall} = \frac{TP}{TP + FN}.$$

F1-score представляет собой гармоническое среднее Precision и Recall и используется для их совместной оценки. Высокое значение F1-score возможно только при одновременных высоких значениях точности и полноты, поэтому метрика учитывает как ложноположительные, так и ложноотрицательные ошибки.

$$\text{F1 score} = \frac{2TP}{2TP + FN + FP}.$$

IoU (intersection over union – пересечение над объединением) характеризует степень совпадения предсказанной моделью маски класса с эталонной маской. В числителе находится область их пересечения, а в знаменателе – объединение предсказанной и эталонной областей. Значение IoU, близкое к 1, соответствует высокому пространственному совпадению сегментации с эталонной разметкой.

$$\text{IoU} = \frac{TP}{TP + FN + FP}.$$

Overall Accuracy (ОА, общая точность классификации) оценивает качество классификации одновременно по всем классам и определяется как отношение суммарного числа правильно классифицированных пикселей всех классов к общему числу пикселей. В отличие от Accuracy, рассчитываемой отдельно для каждого класса, Overall Accuracy является единой итоговой характеристикой многоклассовой классификации изображения.

## Результаты

### Обучение и валидация моделей

При обучении U-Net моделей использован оптимизатор Adam, функция потерь CrossEntropyLoss. В процессе обучения проводились нормализация по среднему и дисперсии (Z-score) и аугментация данных (горизонтальное или вертикальное отражение с вероятностью 0.5 и случайный поворот на 0, 90, 180 или 270 градусов). Модели обучались в течение 50 эпох с начальной скоростью обучения 0.001.

Для сравнения было использовано два обучающих набора данных – мультиспектральные изображения и RGB-изображения. На рис. 4–5 представлена динамика процесса обучения модели U-Net на разных наборах данных.

При обучении модели Random Forest установлены следующие параметры: количество деревьев – 500, минимальный размер терминальных узлов – 1, количество переменных, случайно выбранных в качестве кандидатов при каждом разбиении, – 6.

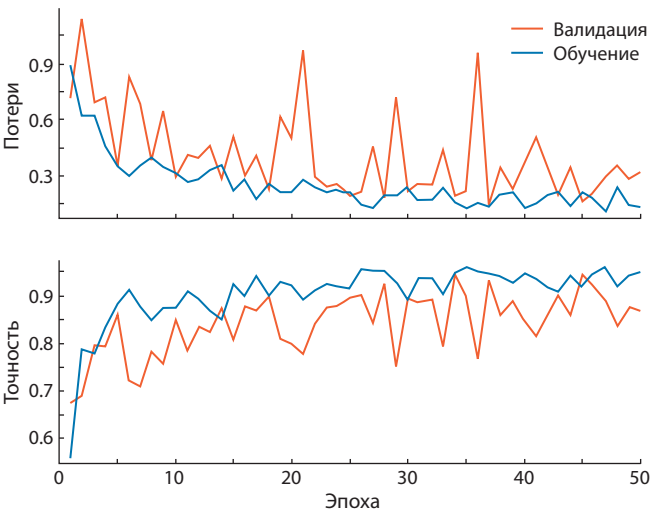


Рис. 4. Графики изменения точности и потерь обучения модели U-Net на мультиспектральных изображениях.

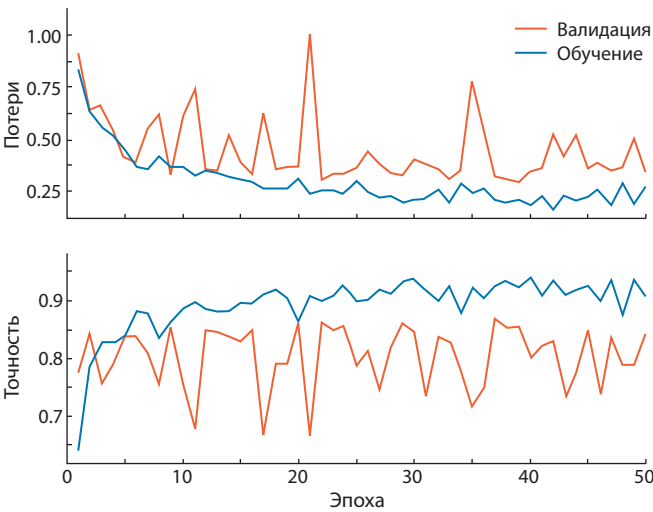


Рис. 5. Графики изменения точности и потерь обучения модели U-Net на RGB-изображениях.

Таблица 1. Метрики качества U-Net модели, обученной на мультиспектральных снимках

| Класс/метрика | Accuracy | Precision | Recall | F1     | IoU    |
|---------------|----------|-----------|--------|--------|--------|
| Почва         | 0.9996   | 0.9994    | 0.9994 | 0.9994 | 0.9989 |
| Больные       | 0.9603   | 0.9370    | 0.9445 | 0.9408 | 0.8882 |
| Здоровые      | 0.9607   | 0.9446    | 0.9370 | 0.9408 | 0.8883 |
| Среднее       | 0.9735   | 0.9603    | 0.9603 | 0.9603 | 0.9251 |

Общая точность классификации – 96.04 %.

Таблица 2. Метрики качества U-Net модели, обученной на RGB-снимках

| Класс/метрика | Accuracy | Precision | Recall | F1     | IoU    |
|---------------|----------|-----------|--------|--------|--------|
| Почва         | 1        | 1         | 1      | 1      | 1      |
| Больные       | 0.9414   | 0.9211    | 0.9015 | 0.9112 | 0.8370 |
| Здоровые      | 0.9414   | 0.9036    | 0.9228 | 0.9131 | 0.8401 |
| Среднее       | 0.9609   | 0.9416    | 0.9414 | 0.9414 | 0.8923 |

Общая точность классификации – 94.14 %.

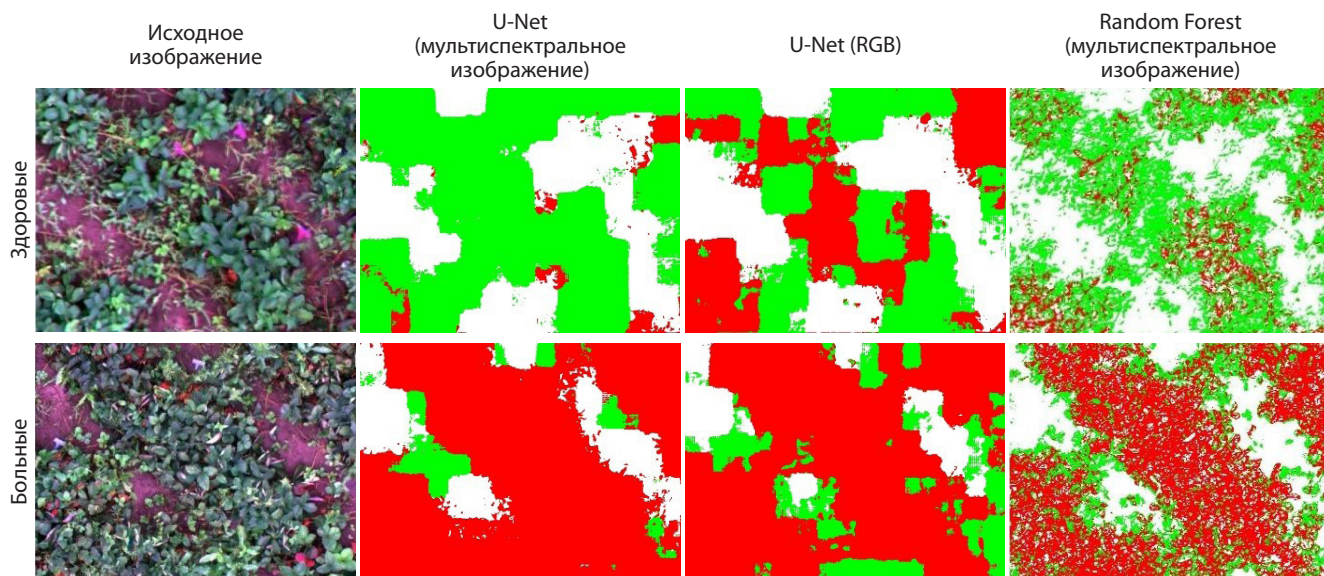
Таблица 3. Метрики качества Random Forest модели, обученной на текстурных характеристиках мультиспектральных снимков

| Класс/метрика | Accuracy | Precision | Recall | F1     | IoU    |
|---------------|----------|-----------|--------|--------|--------|
| Почва         | 0.9563   | 0.9174    | 0.9549 | 0.9358 | 0.8794 |
| Больные       | 0.7968   | 0.7364    | 0.6078 | 0.6660 | 0.4992 |
| Здоровые      | 0.7798   | 0.6496    | 0.7365 | 0.6903 | 0.5271 |
| Среднее       | 0.8443   | 0.7678    | 0.7664 | 0.7641 | 0.6352 |

Общая точность классификации – 76.64 %.

Обученные модели оценены на тестовых выборках. В табл. 1–3 представлены метрики качества моделей. Общая точность классификации U-Net модели, обученной на мультиспектральных снимках, составила 96.04 %. Немного ниже точность классификации U-Net модели,

обученной на RGB-снимках, – 94.14 %. Значительно ниже точность модели Random Forest – всего 76.64 %. Обученные модели были применены для сегментации изображений и построения карт распространения грибных болезней земляники на экспериментальном поле (рис. 6).



**Рис. 6.** Результат сегментации изображений обученными моделями.

Зеленый цвет – здоровые растения; красный – больные растения; белый – почва.

## Обсуждение

В настоящем исследовании оценена возможность выявления болезней земляники садовой (на примере белой пятнистости) по мультиспектральным изображениям, полученным с БПЛА, с использованием архитектуры глубокого обучения U-Net и классического метода Random Forest. Полученные результаты показали, что модель U-Net, обученная на мультиспектральных данных (5 каналов: 450, 560, 650, 730, 840 нм), достигла общей точности классификации 96.04 %, что превосходит точность модели Random Forest (76.64 %) и модели U-Net, обученной только на RGB-изображениях (94.14 %).

Достигнутая точность U-Net (96.04 %) сопоставима или превышает результаты, полученные в других работах по обнаружению болезней сельскохозяйственных культур с помощью БПЛА и глубокого обучения. Например, J. Su с коллегами (2020) и T. Zhang с коллегами (2021) достигли точности 91 и 97 % соответственно при обнаружении желтой ржавчины пшеницы с использованием модификаций U-Net. M. Kerkech с коллегами (2020) показали диапазон точности 85–94 % для различных архитектур (SegNet, DeepLabv3+, PSPNet) при диагностике болезней винограда. Таким образом, наша модель находится на верхней границе этого диапазона, что подтверждает пригодность U-Net для задач фитопатологии земляники.

Более высокая точность мультиспектральной U-Net по сравнению с RGB-версией (96.04 против 94.14 %) объясняется тем, что дополнительные каналы (край красного – 730 нм и ближний ИК – 840 нм) чувствительны к изменениям содержания хлорофилла, структуры мезофилла и водного статуса листа, которые происходят даже при начальных стадиях грибной инфекции до появления видимых пятен. Этот результат согласуется с выводами А.-К. Mahlein с коллегами (2013) и S. Candiago с коллегами (2015) о важности спектральных каналов за

пределами видимого диапазона для ранней диагностики стрессов.

Модель Random Forest, построенная на 40 текстовых признаках GLCM, показала низкую точность (76.64 %), что заметно уступает результатам других исследований, где Random Forest применялся для обнаружения болезней растений: (Liao et al., 2022) – 90 % для болезни эвкалипта; (Zhang S. et al., 2022) – 97 % для фузариозного увядания бананов. Мы связываем это с особенностью симптоматики белой пятнистости земляники: на листьях формируются мелкие (1–5 мм) некротические пятна, не приводящие к глобальному изменению цвета или текстуры всего листа. В отличие от этого, при фузариозном увядании бананов или болезни эвкалипта наблюдается массовое изменение окраски целых листовых пластинок, что хорошо улавливается текстурными признаками на уровне пиксельных окрестностей. GLCM-признаки, рассчитанные для локального окна (в нашем случае – вокруг каждого пикселя), оказались недостаточно чувствительными к мелкоочаговым поражениям.

Полученные результаты убедительно демонстрируют, что глубокое обучение на мультиспектральных БПЛА-снимках является эффективным инструментом для обнаружения белой пятнистости земляники. Преимущество U-Net над Random Forest и над RGB-каналами подтверждает необходимость использования как спектральной информации за пределами видимого диапазона, так и архитектур с автоматическим извлечением признаков.

Предполагаемые направления будущих исследований:

- расширение набора данных, включение большего числа сортов, разных стадий заболевания, а также других болезней земляники;
- сравнение U-Net с более современными архитектурами сегментации (Swin-UNet, TransUNet, Mask2Former) для оценки потенциального прироста точности;



- исследование возможности переноса обучения (transfer learning) с использованием предварительно обученных на крупных наборах данных (PlantCLEF, Agrivision) моделей для снижения потребности в размеченных данных;
- внедрение временных рядов мультиспектральных снимков (съемка каждые 3–5 дней) для раннего обнаружения болезни до появления видимых симптомов.

## Заключение

В результате исследования подтверждена возможность автоматизированного обнаружения белой пятнистости земляники садовой по мультиспектральным изображениям с БПЛА. Модель глубокого обучения U-Net достигла общей точности классификации 96.04 %, что значительно превзошло результат модели Random Forest (76.64 %) и U-Net, обученной только на RGB-снимках (94.14 %). Это доказывает, что архитектура U-Net с механизмами внимания и остаточными связями, а также использование ближнего инфракрасного канала (840 нм) и канала «край красного» (730 нм) являются важными для диагностики заболеваний с мелкоочаговой симптоматикой, когда традиционные текстурные признаки малоинформативны.

Практическая значимость настоящей работы заключается в возможности построения детальных карт распространения инфекции для точечного применения фунгицидов.

## Список литературы / References

- Мударисов С.Г., Мифтахов И.Р. Методы глубокого обучения и технологии БПЛА для идентификации заболеваний сельскохозяйственных растений. *Сельскохозяйственные машины и технологии*. 2024;18(4):24-33. doi 10.22314/2073-7599-2024-18-4-24-33
- [Mudarisov S.G., Miftakhov I.R. Deep learning methods and UAV technologies for crop disease detection. *Sel'skokhozyajstvennyye Mashiny i Tekhnologii = Agricultural Machinery and Technologies*. 2024;18(4):24-33. doi 10.22314/2073-7599-2024-18-4-24-33 (in Russian)]
- Ожерельев В.Н., Ожерельева М.В., Гринь А.М., Сомин В.В. Динамика производства ягод земляники садовой по странам мира. *Вестник Брянской ГСХА*. 2019;4(74):60-66
- [Ozherelev V.N., Ozhereleva M.V., Grin A.M., Somin V.V. Dynamics of garden strawberries production all over the world. *Vestnik of the Bryansk State Agricultural Academy*. 2019;4(74):60-66 (in Russian)]
- Чешкова А.Ф. Обзор современных методов обнаружения и идентификации болезней растений на основе анализа гиперспектральных изображений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(2):202-213. doi 10.18699/VJGB-22-25
- [Cheshkova A.F. A review of hyperspectral image analysis techniques for plant disease detection and identification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2022;26(2):202-213. doi 10.18699/VJGB-22-25]
- Чешкова А.Ф., Риксен В.С. Обнаружение болезней земляники садовой с использованием мультиспектральной съемки с БПЛА. *Сельскохозяйственные машины и технологии*. 2025;19(2):45-52. doi 10.22314/2073-7599-2025-19-2-45-52
- [Cheshkova A.F., Riksen V.S. Strawberry disease detection using multispectral UAV imagery. *Sel'skokhozyajstvennyye Mashiny i Tekhnologii = Agricultural Machinery and Technologies*. 2025;19(2):45-52. doi 10.22314/2073-7599-2025-19-2-45-52 (in Russian)]
- Abade A., Ferreira P.A., Vidal F.B. Plant diseases recognition on images using convolutional neural networks: a systematic review. *Comput Electron Agric*. 2021;185:106125. doi 10.1016/j.compag.2021.106125
- Behmann J., Mahlein A.K., Rumpf T., Römer C., Plümer L. A review of advanced machine learning methods for the detection of biotic stress in precision crop protection. *Precis Agric*. 2015;16:239-260. doi 10.1007/s11119-014-9372-7
- Benos L., Tagarakis A.C., Dolias G., Berruto R., Kateris D., Bochtis D. Machine learning in agriculture: a comprehensive updated review. *Sensors*. 2021;21(11):3758. doi 10.3390/s21113758
- Breiman L. Random forest. *Mach Learn*. 2001;45:5-32. doi 10.1023/A:1010933404324
- Candiago S., Remondino F., De Giglio M., Dubbini M., Gattelli M. Evaluating multispectral images and vegetation indices for precision farming applications from UAV images. *Remote Sens*. 2015;7(4):4026-4047. doi 10.3390/rs70404026
- Ding W., Abdel-Basset M., Alrashdi I., Hawas H. Next generation of computer vision for plant disease monitoring in precision agriculture: a contemporary survey, taxonomy, experiments, and future direction. *Inf Sci*. 2024;665:120338. doi 10.1016/j.ins.2024.120338
- Guo A., Huang W., Dong Y., Ye H., Ma H., Liu B., Wu W., Ren Y., Ruan C., Geng Y. Wheat yellow rust detection using UAV-based hyperspectral technology. *Remote Sens*. 2021;13(1):123. doi 10.3390/rs13010123
- Hou F.J., Zhang Y., Zhou Y., Zhang M., Lv B., Wu J.Q. Review on infrared imaging technology. *Sustainability*. 2022;14(18):26. doi 10.3390/su141811161
- Jin S.C., Sun X.L., Wu F.F., Su Y.J., Li Y.M., Song S.L., Xu K.X., Ma Q., Baret F., Jiang D. Lidar sheds new light on plant phenomics for plant breeding and management: recent advances and future prospects. *ISPRS J Photogramm Remote Sens*. 2021;171:202-223. doi 10.1016/j.isprsjprs.2020.11.006
- Kerkech M., Hafiane A., Canals R. VddNet: Vine Disease Detection Network based on multispectral images and depth map. *Remote Sens*. 2020;12(20):3305. doi 10.3390/rs12203305
- Lan Y., Huang Z., Deng X., Zhu Z., Huang H., Zheng Z., Lian B., Zeng G., Tong Z. Comparison of machine learning methods for citrus greening detection on UAV multispectral images. *Comput Electron Agric*. 2020;171:105234. doi 10.1016/j.compag.2020.105234
- Li S., Yuan F., Ata-UI-Karim S.T., Zheng H., Cheng T., Liu X., Tian Y., Zhu Y., Cao W., Cao Q. Combining color indices and textures of UAV-based digital imagery for rice LAI estimation. *Remote Sens*. 2019;11(15):1763. doi 10.3390/rs11151763
- Liao K., Yang F., Dang H., Wu Y., Luo K., Li G. Detection of eucalyptus leaf disease with UAV multispectral imagery. *Forests*. 2022;13(8):1322. doi 10.3390/f13081322
- Loey M., Elsayy A., Afify M. Deep learning in plant diseases detection for agricultural crops: a survey. *Int J Serv Sci Manage Eng Technol*. 2020;11(2):18. doi 10.4018/IJSSMET.2020040103
- Mahlein A.-K., Rumpf T., Welke P., Dehne H.-W., Plümer L., Steiner U., Oerke E.-C. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sens Environ*. 2013;128:21-30. doi 10.1016/j.rse.2012.09.019
- Maxwell A.E., Farhadpour S., Das S., Yang Y. geodl: an R package for geospatial deep learning semantic segmentation using torch and terra. *PLoS One*. 2024;19(12):e0315127. doi 10.1371/journal.pone.0315127
- Moustakas M., Calatayud Á., Guidi L. Chlorophyll fluorescence imaging analysis in biotic and abiotic stress. *Front Plant Sci*. 2021;12:658500. doi 10.3389/fpls.2021.658500
- Nagaraju M., Chawla P. Systematic review of deep learning techniques in plant disease detection. *Int J Syst Assur Eng Manage*. 2020;11(3):547-560. doi 10.1007/s13198-020-00972-1
- Neupane K., Baysal-Gurel F. Automatic identification and monitoring of plant diseases using unmanned aerial vehicles: a review. *Remote Sens*. 2021;13(19):3841. doi 10.3390/rs13193841

- Phang S.K., Chiang T.H.A., Happonen A., Chang M.M.L. From satellite to UAV-based remote sensing: a review on precision agriculture. *IEEE Access*. 2023;11:127057-127076. doi 10.1109/ACCESS.2023.3330886
- Radoglou-Grammatikis P., Sarigiannidis P., Lagkas T., Moscholiou I. A compilation of UAV applications for precision agriculture. *Comput Networks*. 2020;172:107148. doi 10.1016/j.comnet.2020.107148
- Ronneberger O., Fischer P., Brox T. U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation. In: Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science. Vol. 9351. Springer, 2015;234-241. doi 10.1007/978-3-319-24574-4\_28
- Sajitha P., Andrushia A.D., Anand N., Naser M.Z. A review on machine learning and deep learning image-based plant disease classification for industrial farming systems. *J Ind Inf Integr*. 2024;38:100572. doi 10.1016/j.jii.2024.100572
- Saleem M.H., Potgieter J., Arif K.M. plant disease detection and classification by deep learning. *Plants*. 2019;8(11):468. doi 10.3390/plants8110468
- Singh A., Ganapathysubramanian B., Singh A.K., Sarkar S. Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. *Trends Plant Sci*. 2016;21(2):110-124. doi 10.1016/j.tplants.2015.10.015
- Su J., Yi D., Su B., Mi Z., Liu C., Hu X., Xu X., Guo L., Chen W.H. Aerial visual perception in smart farming: field study of wheat yellow rust monitoring. *IEEE Trans Ind Inf*. 2020;17(3):2242-2249. doi 10.1109/TII.2020.2979237
- Toscano F., Fiorentino C., Capece N., Erra U., Travascia D., Scopa A., Drosos M., D'Antonio P. Unmanned aerial vehicle for precision agriculture: a review. *IEEE Access*. 2024;12:69188-69205. doi 10.1109/ACCESS.2024.3401018
- Zahir S.A.D.M., Omar A.F., Jamlos M.F., Azmi M.A.M., Muncan J. A review of visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy application in plant stress detection. *Sens Actuators A*. 2022;338:113468. doi 10.1016/j.sna.2022.113468
- Zhang S., Li X., Ba Y., Lyu X., Zhang M., Li M. Banana fusarium wilt disease detection by supervised and unsupervised methods from UAV-based multispectral imagery. *Remote Sens*. 2022;14(5):1231. doi 10.3390/rs14051231
- Zhang T., Xu Z., Su J., Yang Z., Liu C., Chen W.-H., Li J. Ir-UNet: irregular segmentation U-shape network for wheat yellow rust detection by UAV multispectral imagery. *Remote Sens*. 2021;13(19):3892. doi 10.3390/rs13193892
- Zheng C., Abd-Elrahman A., Whitaker V. Remote sensing and machine learning in crop phenotyping and management, with an emphasis on applications in strawberry farming. *Remote Sens*. 2021;13(3):531. doi 10.3390/rs13030531
- Zhou C., Gong Y., Fang S., Yang K., Peng Y., Wu X., Zhu R. Combining spectral and wavelet texture features for unmanned aerial vehicles remote estimation of rice leaf area index. *Front Plant Sci*. 2022;13:957870. doi 10.3389/fpls.2022.957870

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.04.2026. После доработки 15.06.2026. Принята к публикации 16.06.2026.

doi 10.18699/vjgb-26-98

# Visual analysis of sorrel (*Rumex* spp.) genotypes by the biplot method using morphological characters

N. Sabaghnia <sup>1</sup>, M. Mohebodini <sup>2</sup>, M. Janmohammadi <sup>1</sup>, M. Erfani <sup>2</sup>, K. Farmanpour-Kalalagh <sup>3</sup><sup>1</sup> Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran<sup>2</sup> Department of Horticultural Science, Faculty of Agricultural Science and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran<sup>3</sup> Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran sabaghnia@maragheh.ac.ir

**Abstract.** Sorrel (*Rumex* spp.) belongs to Polygonaceae. It is distributed worldwide and used as vegetable crop and medicinal plant, so considerable research has been dedicated to its cultivation. Forty-four accessions from the Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Germany, and ten genotypes collected from some areas of Iran were grown in two separate trials. The trials followed a completely randomized scheme with three replicates in a greenhouse environment. Seven traits were assessed: leaf length, blade length, lamina area, number of veins, petiole diameter, number of leaves, and dry leaf weight. The genotype  $\times$  trait interaction (GTI) biplot model accounted for 77 and 78 % of the observed variability in the first and second trials, respectively. A nonagon and a heptagon were identified in trials, respectively, while genotypes 16 and 23 showed high mean values of dry leaf weight in the first and second trials, respectively. Genotypes 44 and 50 were identified as perfect genotypes, highly promising for sorrel genetic improvement programs, especially with regard to leaf yield. As for discriminative capacity, as well as typical potential, lamina area and petiole diameter best demonstrated differences among genotypes as perfect traits in both trials. There was a moderate positive correlation between dry leaf weight and lamina area across both trials ( $r = 0.57$  for the first trial and  $r = 0.49$  for the second trial). Therefore, lamina area can be considered an informative trait for constructing a selection index to improve leaf yield, along with dry leaf weight. The results demonstrate that lamina area and petiole diameter are key traits for selecting high-yielding sorrel genotypes, and the GTI biplot provides a practical visual approach to identify superior genotypes, facilitating efficient selection in breeding. Such a strategy can be recommended for future studies to describe prognostic and meticulous selection methods in order to recognize best traits for the breeding of sorrel and other vegetable crops.

**Key words:** dry leaf weight; discriminative capacity; perfect genotype; typical potential

**For citation:** Sabaghnia N., Mohebodini M., Janmohammadi M., Erfani M., Farmanpour-Kalalagh K. Visual analysis of sorrel (*Rumex* spp.) genotypes by the biplot method using morphological characters. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(6):973-980. doi 10.18699/vjgb-26-98

**Acknowledgements.** We are grateful to the Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany, for supplying sorrel accessions. Also, we would like to express our gratitude to Dr. W. Yan (Agriculture and Agri-Food Canada) for providing the GGEbiplot application.

## Визуальный анализ генотипов щавеля (*Rumex* spp.) биplot-методом с использованием морфологических признаков

Н. Сабaghния <sup>1</sup>, М. Моhebодини <sup>2</sup>, М. Джанмохаммади <sup>1</sup>, М. Эрфани <sup>2</sup>, К. Фарманпур-Калалаг <sup>3</sup><sup>1</sup> Кафедра растениеводства и генетики, факультет сельского хозяйства, Университет Мараге, Мараге, Иран<sup>2</sup> Кафедра садоводства, факультет сельскохозяйственных наук и природных ресурсов, Университет Мохаве Ардабили, Ардабил, Иран<sup>3</sup> Кафедра садоводства, факультет сельского хозяйства, Университет Тарбият Модарес, Тегеран, Иран sabaghnia@maragheh.ac.ir

**Аннотация.** Щавель (*Rumex* spp.) относится к семейству Polygonaceae, распространен по всему миру и используется как овощная культура и лекарственное растение, поэтому его культивирование стало предметом многочисленных исследований. В двух отдельных экспериментах были выращены 44 образца из Института генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур (IPK, Германия) и 10 генотипов, собранных в разных районах Ирана. Эксперименты проводились в тепличных условиях по полностью рандомизированной схеме в трех повторениях, в ходе которых оценивались семь признаков: длина листа, длина листовой пластинки, площадь листовой пластинки, количество жилок, диаметр черешка, количество листьев и сухая масса листа. Оценка взаимодействия генотипа и признака (GTI) методом биplot-анализа объяснила 77 и 78 % наблюдаемой изменчивости в первом и втором экспериментах соответственно. В ходе испытаний были выявлены два типа расположения генотипов: нонагональное в первом и гептагональное во втором испытании, при этом генотипы 16 и 23 показали высокие средние значения сухой массы листьев в первом и втором испытаниях соответственно. Генотипы 44 и 50 были



определены как идеальные, имеющие решающее значение для программы генетического улучшения щавеля, особенно с точки зрения урожайности листьев. Что касается дискриминационной способности, а также типичного потенциала, площадь листовой пластинки и диаметр черешка позволили выявить различия между генотипами как идеальными признаками в обоих испытаниях. Между сухой массой листьев и площадью листовой пластинки в обоих экспериментах наблюдалась умеренная положительная корреляция ( $r = 0.57$  для первого эксперимента,  $r = 0.49$  для второго эксперимента). Таким образом, площадь листовой пластинки можно считать информативным признаком для построения индекса отбора с целью повышения урожайности листьев, наряду с сухой массой. Результаты показывают, что площадь листовой пластинки и диаметр черешка являются ключевыми признаками для отбора высокоурожайных генотипов щавеля, а биplot-метод оценки GTI предоставляет практичный визуальный подход для выявления лучших генотипов, способствуя эффективному отбору в селекции. Подобная стратегия может быть рекомендована в будущих исследованиях для описания прогностических и тщательных методов отбора, которые помогут определить идеальные признаки для селекции щавеля и других овощных культур.

**Ключевые слова:** сухая масса листьев; дискриминационная способность; идеальный генотип; типичный потенциал

## Introduction

One of the ways to evaluate genetic diversity is the examination of morphological traits, which is relatively simple and inexpensive, so it is used to analyze genetic diversity in different crops. There are about 200 species of sorrel (*Rumex* spp.) around the world, and some of them are known as edible vegetables or traditionally used for medicinal purposes. The genus *Rumex* belongs to the Polygonaceae family, whose species are scattered all over the world. Many sorrel species have high economic value. They are used as both vegetables and medicinal plants, where roots, leaves, seeds, and herbal extract are generally utilized. Sorrel leaves are used as food in some areas (Li et al., 2022). *Rumex rugosus* Campd. is a stable plant, which has a branched stem and relatively small leaves. Its rapid spread in nature is due to the fact that buds appear on its underground and creeping stems. *Rumex patientia* L. is a perennial plant with very large, long, heart-shaped leaves with wavy edges and its root contains anthraquinone glucosides and tannin, whereas *Rumex alpinus* L. is a large and stable plant with a thick, heart-shaped leaves. Its raw leaves are eaten like spinach in salads, and while its petiole is used like asparagus (Vasas et al., 2015). *Rumex pulcher* L. is a biennial plant with leaves with a noticeable depression near the wide base, so the leaf has a velvet-like appearance. In the context of herbal medicine, its root has an appetizing effect. *Rumex sculatus* L. has relatively woody stems with thick bushes, and it is usually found on old walls, stony ground, ditches and similar places (Bourang et al., 2023). *Rumex pseudonatronatus* Murb. is a perennial herb native to Europe and Asia, often branching above the middle. It grows in wet and disturbed locations along lake shores, roadsides, fields, meadows. *Rumex obtusifolius* L. is a perennial herb up of 40 to 150 cm in height. It has large oval leaves, which can be eaten as salad or cooked like spinach (Mohebodini et al., 2020). *Rumex kernerii* Borbas is native to Europe and has been observed in some areas as an introduced species and roadside weed. It produces a slender erect stem from a thick taproot (Mohebodini et al., 2020).

The species of sorrel are rich in ascorbic acid and secondary metabolites: oxalic acid, phenolic acids, flavonoid compounds, phenolic compounds, anthraquinone, naphthalene, sterols and triterpenes, etc. (Vasas et al., 2015). The important anthraquinone emodin is produced in many species of this genus in their roots, seeds, leaves, stems, and flowers (Li et al., 2022). Therefore, it is important to identify and choose a suitable spe-

cies or modify and introduce a variety of this valuable plant. In plant breeding, the first step is to select the most suitable individuals, so it is necessary first to collect and evaluate the genetic material and then apply proper breeding methods to it. Due to the importance of this plant, studies have been conducted in various fields to investigate its genetic diversity. While previous studies have examined the fruit morphology of sorrel species (Shahla et al., 2014), these traits alone are insufficient to distinguish taxa due to overlapping characteristics. Therefore, our study focuses on leaf morphological traits critical for evaluating the leaf yield potential and for selecting superior genotypes in breeding programs. The genetic variation of some genotypes of five *Rumex* species has been assessed using morphological traits, and the highest variation coefficients have been found in fresh and dry yield of leaves and in leaf number (Bourang et al., 2023). Also, the contents of phenols and antioxidants are higher in *R. crispus* than in other species, whereas *R. tuberosus* shows lower amounts in the measured morphologic and chemical characteristics in comparison to other species examined.

One of the most effective ways to assess genetic diversity involves the analysis of morphological traits, which is simple, cost-effective, and informative for plant breeding programs. Sorrel (*Rumex* spp.) comprises about 200 species worldwide, some of which are cultivated as leafy vegetables or used for medicinal purposes. Despite its economic and nutritional importance, there is limited knowledge regarding the morphological diversity of sorrel genotypes, particularly in relation to leaf yield performance. Identifying superior genotypes and key traits is crucial for improving leaf production and guiding breeding programs.

The objectives of this study were to: (1) evaluate genetic variation among 54 sorrel genotypes from international and local collections using leaf morphological traits, (2) assess genotype  $\times$  trait interactions using the GTI biplot method, (3) identify best genotypes for leaf yield, and (4) determine the most informative traits for discriminating genotypes. This knowledge is essential for selecting promising genotypes and traits to enhance leaf yield in sorrel breeding programs under greenhouse conditions. This study aims to provide practical guidance for sorrel breeding by identifying superior genotypes and key morphological traits, thereby enabling breeders to make informed decisions and accelerate the development of high-yielding cultivars.

**Table 1.** Codes and species types of sorrel genotypes (The first ten were collected in Iran, and the other were obtained from Genbank of the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany)

| Code | Species                  | Origin     | Code | Species                          | Origin             |
|------|--------------------------|------------|------|----------------------------------|--------------------|
| 1    | <i>Rumex</i> spp.        | Kashmar    | 28   | <i>R. rugosus</i> Campd.         | Hungary            |
| 2    | <i>Rumex</i> spp.        | Marand     | 29   | <i>R. patientia</i> L.           | DPRK               |
| 3    | <i>Rumex</i> spp.        | Ardabil    | 30   | <i>R. rugosus</i> Campd.         | Russian Federation |
| 4    | <i>Rumex</i> spp.        | Hour       | 31   | <i>R. pulcher</i> L.             | Unknown            |
| 5    | <i>Rumex</i> spp.        | Nier       | 32   | <i>R. rugosus</i> Campd.         |                    |
| 6    | <i>Rumex</i> spp.        | Namin      | 33   | <i>R. patientia</i> L.           | Germany            |
| 7    | <i>Rumex</i> spp.        | Khalkhal   | 34   | <i>R. alpinus</i> L.             | Poland             |
| 8    | <i>Rumex</i> spp.        | Dezfol     | 35   | <i>R. rugosus</i> Campd.         | Unknown            |
| 9    | <i>Rumex</i> spp.        | Ahwaz      | 36   | <i>R. patientia</i> L.           | Pakistan           |
| 10   | <i>Rumex</i> spp.        | Shiraz     | 37   | <i>R. rugosus</i> Campd.         | Unknown            |
| 11   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Germany    | 38   | <i>R. rugosus</i> Campd.         |                    |
| 12   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Unknown    | 39   | <i>R. rugosus</i> Campd.         |                    |
| 13   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Germany    | 40   | <i>R. pseudonatronatus</i> Murb. | Russian Federation |
| 14   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Tajikistan | 41   | <i>R. rugosus</i> Campd.         | Unknown            |
| 15   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Slovakia   | 42   | <i>R. scutatus</i> L.            | Germany            |
| 16   | <i>R. rugosus</i> Campd. | GDR        | 43   | <i>R. rugosus</i> Campd.         | Unknown            |
| 17   | <i>R. rugosus</i> Campd. |            | 44   | <i>R. obtusifolius</i> L.        |                    |
| 18   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Kazakhstan | 45   | <i>R. kernerii</i> Borbas        | Albania            |
| 19   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Ukraine    | 46   | <i>R. patientia</i> L.           | Unknown            |
| 20   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Tajikistan | 47   | <i>R. patientia</i> L.           |                    |
| 21   | <i>R. rugosus</i> Campd. | USSR       | 48   | <i>R. patientia</i> L.           | Georgia            |
| 22   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Germany    | 49   | <i>R. obtusifolius</i> L.        | Unknown            |
| 23   | <i>R. rugosus</i> Campd. | Unknown    | 50   | <i>R. obtusifolius</i> L.        | Romania            |
| 24   | <i>R. rugosus</i> Campd. |            | 51   | <i>R. patientia</i> L.           | Unknown            |
| 25   | <i>R. rugosus</i> Campd. |            | 52   | <i>R. alpinus</i> L.             | Italy              |
| 26   | <i>R. rugosus</i> Campd. |            | 53   | <i>R. alpinus</i> L.             | Georgia            |
| 27   | <i>R. rugosus</i> Campd. |            | 54   | <i>R. patientia</i> L.           | Unknown            |

Note. GDR, German Democratic Republic; USSR, Union of Soviet Socialist Republics; DPRK, Democratic People’s Republic of Korea.

Materials and methods

**Trials, plant materials and traits.** Two independent trials were performed to discover the interrelationships between leaf dry yield and some morphologic traits in 54 sorrel genotypes (Table 1), which had been acquired from the Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Germany, or collected from some regions of Iran; as the latter could not be reliably identified to species, they are referred to as *Rumex* spp.

The study was centered on genotype × trait interactions, and all accessions, regardless of species, were included to capture the phenotypic diversity relevant to leaf yield improvement. These species were *R. alpinus*, *R. kernerii*, *R. obtusifolius*, *R. patientia*, *R. pseudonatronatus*, *R. pulcher*, *R. rugosus*, *R. scutatus*, and *Rumex* spp. Seeds of each genotype were sown individually in 30-cm diameter pots, one plant per pot. The experiment was arranged in a completely randomized design with three replications. Each genotype was represented by three plants per replication, providing sufficient replication for reliable estimation of morphological traits and leaf dry weight.

Plants were grown under greenhouse conditions with a 12/12 h day/night schedule at 25/15 °C, using a 1:2:1 mixture of loamy soil, sand, and organic fertilizer. Irrigation and weeding were performed regularly throughout the growth period.

The morphologic traits were estimated as recommended by Mohebodini et al. (2020): leaf length (LL), blade length (BL), lamina area (LA), number of veins (NV), petiole diameter (PD), number of leaves (NL), and leaf dry weight (DW) with the use of a laboratory caliper, leaf area meter device, and lab scales. Leaf dry weight (DW) was measured by harvesting all leaves from each plant at the end of the growth period. The leaves were then oven-dried at 70 °C until complete desiccation and weighed. Focusing on leaf dry weight allows breeders to select genotypes that maximize the most valuable component for consumption and breeding purposes. Although leaf dry weight was the primary trait of interest, additional morphological traits were measured as component traits contributing to leaf biomass. Separate analyses were performed for each trial to account for minor differences in greenhouse conditions that might influence trait manifestation.

**Statistical data analysis.** The normality of the measured traits was assessed using the Anderson–Darling test. All traits in both trials showed no significant deviation from normality ( $p > 0.05$ ), confirming that the data were suitable for correlation analysis and subsequent GTI biplot modeling. Simple correlation coefficients between the traits were calculated using IBM-SPSS 25.0 (IBM-SPSS, Chicago, USA). For obtaining deeper insights into the interrelationships between traits and identifying those with the greatest impact on yield performance, the genotype  $\times$  trait interaction (GTI) biplot model in the principal component analysis (PCA) layout was employed (Yan, Frégeau-Reid, 2018). The fitted model was generated with the GGEbiplot application, following the equation (Xu et al., 2017):

$$\frac{g_{ij} - t_j}{SD_j} = \sum_{n=1}^2 \lambda_n \alpha_{in} \beta_{jn} + \theta_{ij},$$

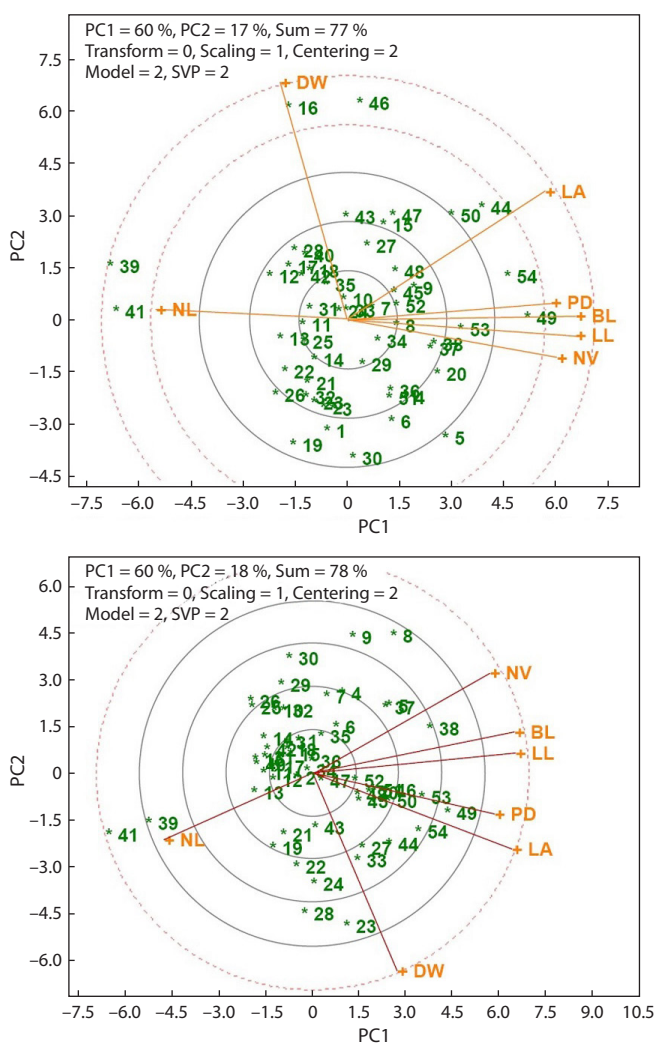
where  $g_{ij}$  is the performance of genotype  $i$  for trait  $j$ ,  $t_j$  is the means of all  $g_{ij}$ s in trait  $j$ ,  $SD_j$  is the standard error for trait  $j$ ,  $\lambda_n$  is the eigenvalue for PCAn,  $\alpha_{in}$  and  $\beta_{jn}$  are the amounts for genotype  $i$  and trait  $j$  in PCAn, respectively, and  $\theta_{ij}$  is the magnitude of model residuals.

To obtain symmetrical values of genotypes and traits in the biplot, the eigenvalues ( $\lambda$ ) of the principal components were adjusted using a scaling procedure to balance genotype and trait scores, enabling a clear graphical representation of the relationships among genotypes, traits, and their interactions. The transformed dataset was processed to enable clear graphical interpretation of GTI. Data were centered by trait mean (centering), scaled to make trait variations comparable (scaling), and analyzed using singular value decomposition (SVD) to obtain principal components. The scores for genotypes and traits were adjusted to produce a symmetric biplot, allowing accurate visualization of relationships among genotypes, traits, and their interactions. In the polygon and vector-view plots, circles represent ideal or reference points; the perfect genotype or perfect trait, derived from maximum observed trait values. Orange and green lines indicate the directions and magnitudes of trait vectors, connecting each genotype or trait to the origin for visualizing relationships and correlations. Genotypes or traits closest to these circles are considered optimal or most informative, respectively.

## Results and discussion

### Model fitting

The PC1 and PC2 of the fitted GTI biplot model accounted for 60 to 17 % of the variation in the first trial and 60 to 18 % of the variation in the second trial within the datasets on sorrel (Fig. 1), indicating a substantial proportion of variation that demonstrated relationships among traits. Vectors were generated from the origin to the traits to explore such associations and to ease the explanations of interactions among traits (Yan, 2024). This fitted model pointed to the existence of the additive and crossover types of interaction, recommending that the rating of genotype in measured traits be altered. This is consistent with reports by Sabaghnia et al. (2015) on spinach and Sabaghnia et al. (2023) on garden cress, which emphasizes the complication of genotype selection without regarding



**Fig. 1.** The vector diagram showing relationships among traits of sorrel in (upper panel) the first trial and (lower panel) the second trial.

GTI. In this research, the fitted biplot model, as suggested by Xu et al. (2017), proved to be successful for surveying and envisaging genotypes by trait associations. The fitted biplot model explained a remarkable magnitude of variation, with trait correlations revealed by the cosines of vectors.

### Vector-view analysis

According to Figure 1, outstanding relationships included: (i) positive correlations among leaf length (LL), blade length (BL), petiole diameter (PD) and number of veins (NV); cosine  $0^\circ = +1$ ; (ii) negative correlations of number of leaves (NL) with LL, BL, PD, and NV; cosine  $180^\circ = -1$ ; (iii) near-zero association between leaf dry weight (DW) and number of leaves (NL); cosine  $90^\circ = 0$ ; and (iv) near-zero association of leaf DW with LL, BL, PD and NV in the first trial. Also, outstanding relationships in the second trial included: (i) positive correlations between leaf length (LL) and blade length (BL); (ii) positive correlations between lamina area (LA) and petiole diameter (PD); (iii) negative correlations between number of leaves (NL) and number of veins (NV); (iv) near-zero association between leaf dry weight (DW) and



**Table 2.** Correlations among traits of sorrels for (up diagonal) the first and (down diagonal) the second trial

|    | BL    | LA    | PD    | NV    | NL    | LL    | DW   |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| BL |       | 0.70  | 0.59  | 0.84  | –0.42 | 0.83  | 0.20 |
| LA | 0.64  |       | 0.74  | 0.52  | –0.56 | 0.68  | 0.57 |
| PD | 0.70  | 0.57  |       | 0.44  | –0.47 | 0.68  | 0.33 |
| NV | 0.79  | 0.49  | 0.53  |       | –0.49 | 0.70  | 0.01 |
| NL | –0.47 | –0.72 | –0.43 | –0.58 |       | –0.52 | 0.01 |
| LL | 0.81  | 0.61  | 0.76  | 0.66  | –0.58 |       | 0.27 |
| DW | –0.19 | 0.49  | –0.15 | –0.27 | 0.30  | –0.28 |      |

Note. Significant magnitudes of correlation  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  (with degrees of freedom = 52) are 0.27 and 0.35, respectively.

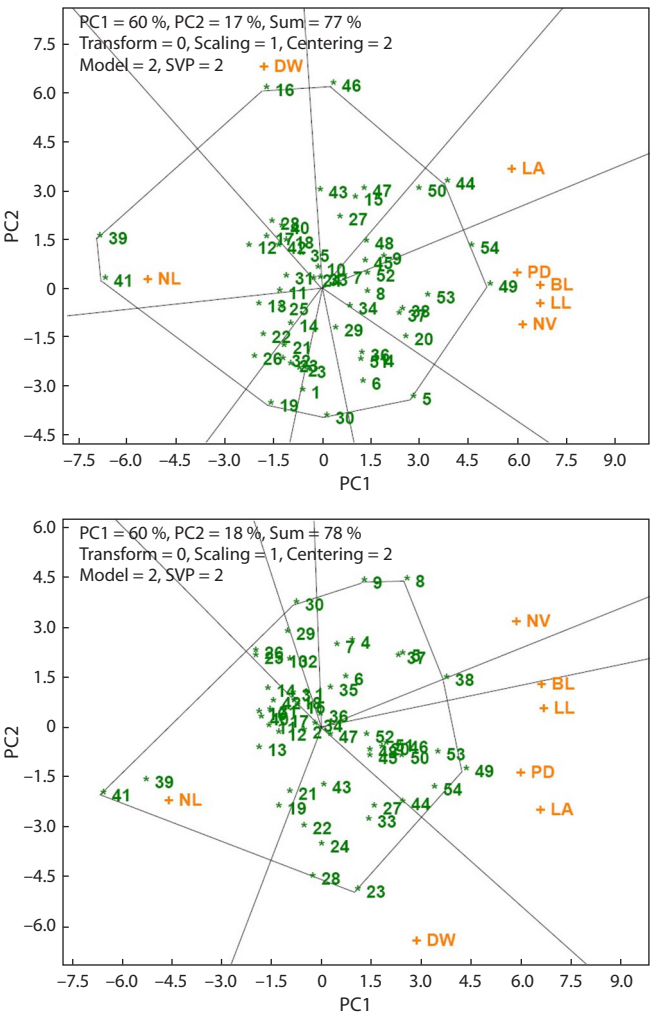
number of leaves (NL); and (v) near-zero association between leaf dry weight (DW) and number of veins (NV). This agrees with findings by Mohebodini et al. (2020), who have shown positive correlations among leaf properties like leaf area and leaf length, as well as petiole diameter and number of veins, in various species of *Rumex*.

However, there was a moderate positive association between leaf dry weight (DW) with lamina area (LA) across both trials (Fig. 1), so lamina area should be considered in the determination of the selection index in sorrel breeding programs. Generally, the fitted biplot model provided an obvious visual indication of trait relations in sorrel, in agreement with the report by Bourang et al. (2023), who have found positive correlations between leaf dry weight and lamina area in some sorrel species. It should be noted that while the biplot method illustrates trait associations according to the structure of the dataset, correlation coefficients (Table 2) measure the direct interrelationship of traits and may not always directly align with the biplot results.

Polygon-view analysis

Figure 2 demonstrates how the GTI biplot model illustrates genotypes and their comparison with regard to certain traits and detects those superior in specific sections, identifying them as candidates for using in breeding programs or releasing as commercial cultivars. A nonagon was identified in the first trial (Fig. 2), while the perpendicular lines to its sides ease comparison of the vertex genotypes. However, only four vertex genotypes showed the highest values of some traits; genotype 49 had the largest averages for leaf length (LL), blade length (BL), number of veins (NV) and petiole diameter (PD); genotype 44 showed the largest lamina area (LA); genotype 39 demonstrated the greatest number of leaves (NL); and genotype 16 was superior in mean leaf dry weight (DW) in the first trial. Conversely, five vertex genotypes (5, 19, 30, 41, and 46) did not show superior performance in any of the measured traits in the first trial.

In the second trial, a heptagon was detected (Fig. 2), while only four vertex genotypes indicated the highest values for measured traits: genotype 49 had the large averages for leaf length (LL), blade length (BL), lamina area (LA) and petiole diameter (PD); genotype 41 showed a large number of leaves (NL); genotype 23 had a large leaf dry weight (DW); and genotype 8 showed a high mean for number of veins (NV) in the second trial. In contrast, three vertex genotypes (9, 30,



**Fig. 2.** The nonagon (upper panel) and the heptagon (lower panel) showing relationships among traits and genotypes of sorrel in the first and second trials, respectively.

and 38) did not manifest the most favorable performance in any of the traits in the second trial.

The benefits of the applied GTI biplot model are similar to those reported in other vegetable and field crops like quince (Rahimi et al., 2019) and safflower (Ebrahimi et al., 2023), showing that the method used in our study should be successful in extraction of useful outputs. The differing polygon shapes observed in the two trials – nonagon in the first and heptagon

in the second – reflect the number of genotypes that were extreme for one or more traits in each trial. These differences likely result from minor variations in greenhouse conditions, which affected genotype performance and trait expression. This observation emphasizes that genotypes may respond differently to environmental conditions, even in controlled trials, and highlights the importance of multi-trial evaluation for reliable selection of superior genotypes.

### Perfect genotype position

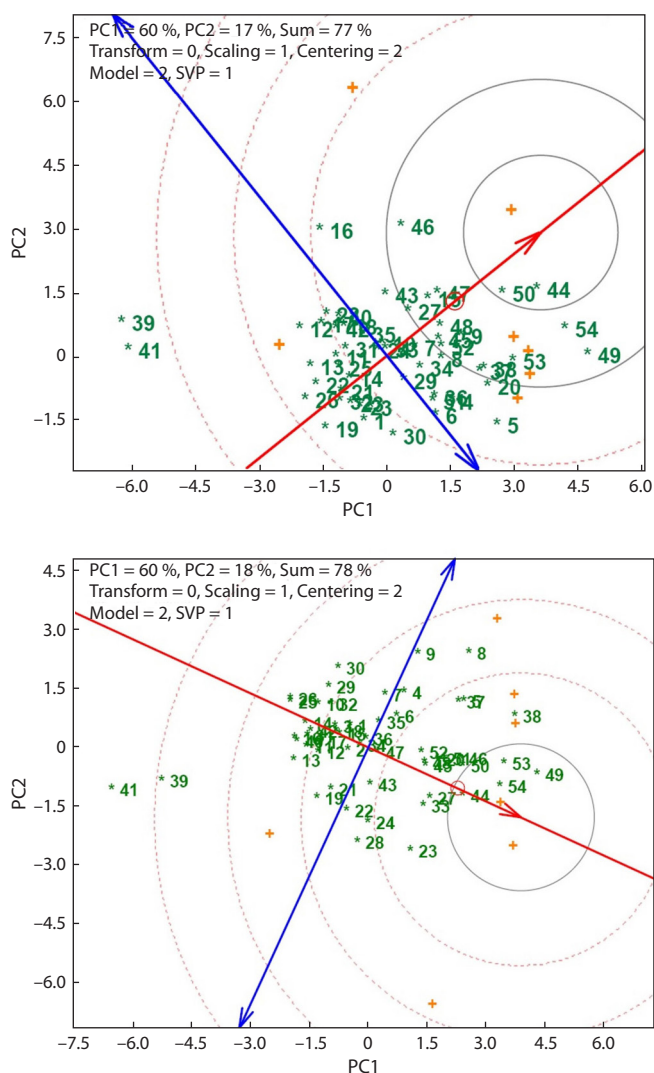
Figure 3 indicates the position of a perfect genotype, and the genotypes closest to this position are considered the best, so genotypes 44 and 50, followed by genotypes 47, 49, 53 and 54, were the closest to this position, indicating their superior performance in the first trial. Genotypes 39 and 41, although positioned farthest from the perfect genotype in the biplot, had the greatest number of leaves. However, this resulted in lower aggregate scores when considering multiple traits simultaneously. Hence, these genotypes can still be valuable in breeding programs, particularly for increasing leaf number in combination with traits such as lamina area and leaf dry weight.

Similarly, in the second trial, genotypes 44, 49, 50, 53 and 54 were close to the perfect genotype (Fig. 3), showing their favorable performance, while genotypes 39 and 41 were located farthest from this position, regarding them less favorable in the second trial. These identified perfect genotypes are crucial for a sorrel genetic improvement program, especially since leaf yield performance and yield components often show low correlations in many vegetable crops (Shukla et al., 2016); thus, the employment of graphic multivariate models is vital for determining perfect genotypes and enhancing sorrel breeding strategies.

While leaf dry weight is the ultimate trait of interest for sorrel breeding, component traits such as lamina area, petiole diameter, and number of veins provide valuable information on leaf structure, expansion, and resource allocation. In some cases, genotypes with a large number of small leaves showed lower dry weight, reflecting the natural compromise between leaf size and leaf number. The GTI biplot enables simultaneous evaluation of multiple traits, capturing both additive and cross-over interactions, and helps in the identification of genotypes with balanced performance across all important leaf characteristics. Although dry weight can be used alone for selection, the multivariate approach provides a more comprehensive assessment for breeding programs. Minor differences in greenhouse conditions between the two trials, such as temperature and light intensity, influenced trait expression, which justifies separate trial analyses. The observed differences in vertex genotypes across trials highlight genotype sensitivity to environmental variation and emphasize the importance of multi-trial evaluation to identify stable high-performing genotypes.

### Perfect trait position

The discriminative capacity for a trait is the magnitude of the standard deviation that marks genotypes as different and can be shown by a perfect trait with such a hypothetical position (Fig. 4) that traits closer to this position have better discriminative capacities and farther traits are inferior in discriminative

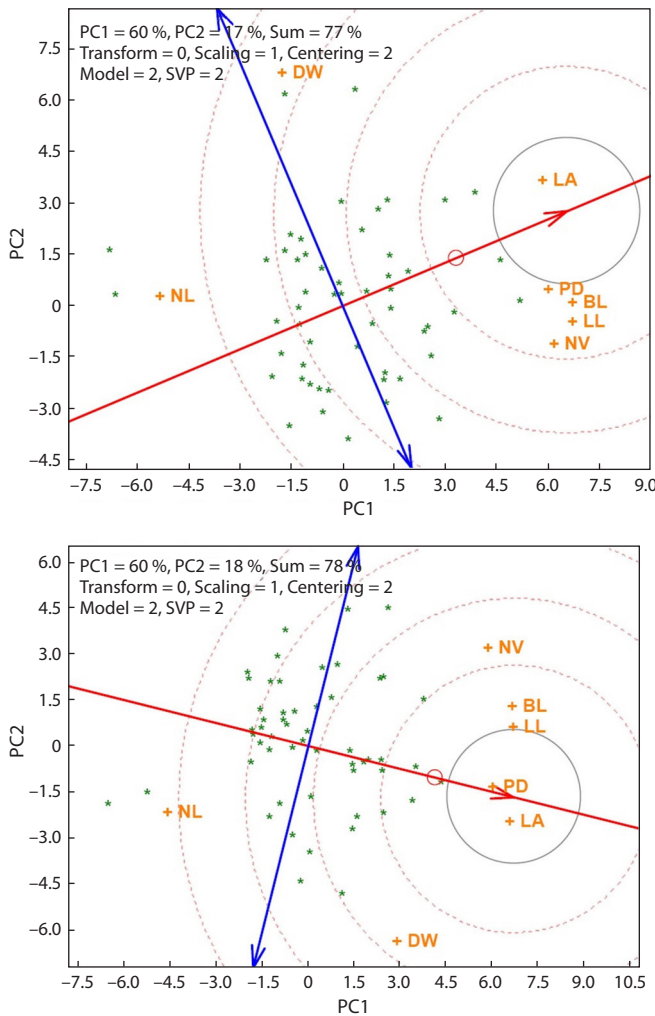


**Fig. 3.** The perfect genotype diagram showing the positions of sorrel genotypes in (upper panel) the first trial and (lower panel) the second trial.

capacity. Based on the perfect trait biplot of the first trial, the following (in the descending order) traits were identified as most discriminative: lamina area (LA) followed by petiole diameter (PD), blade length (BL), leaf length (LL), and number of veins (NV). In contrast, traits such as number of leaves (NL) and leaf dry weight (DW) had low discriminative potentials in the first trial (Fig. 4); thus, they are not advised for future studies for distinguishing differences among sorrel genotypes.

According to the perfect trait biplot of the second trial, lamina area (LA) and petiole diameter (PD), followed by blade length (BL) and leaf length (LL), were found to possess best discriminative capacities. Also, number of veins (NV) and leaf dry weight (DW) have a discriminative potential above average, indicating that they are effective in differentiating among sorrel genotypes in the second trial (Fig. 4). Finally, number of leaves (NL) had a low discriminative potential in the second trial, and it is not recommended for future investigations for revealing differences among sorrel genotypes.

The typical potential of a trait, showing its symbolic importance, is characterized by the angle between the trait's vector

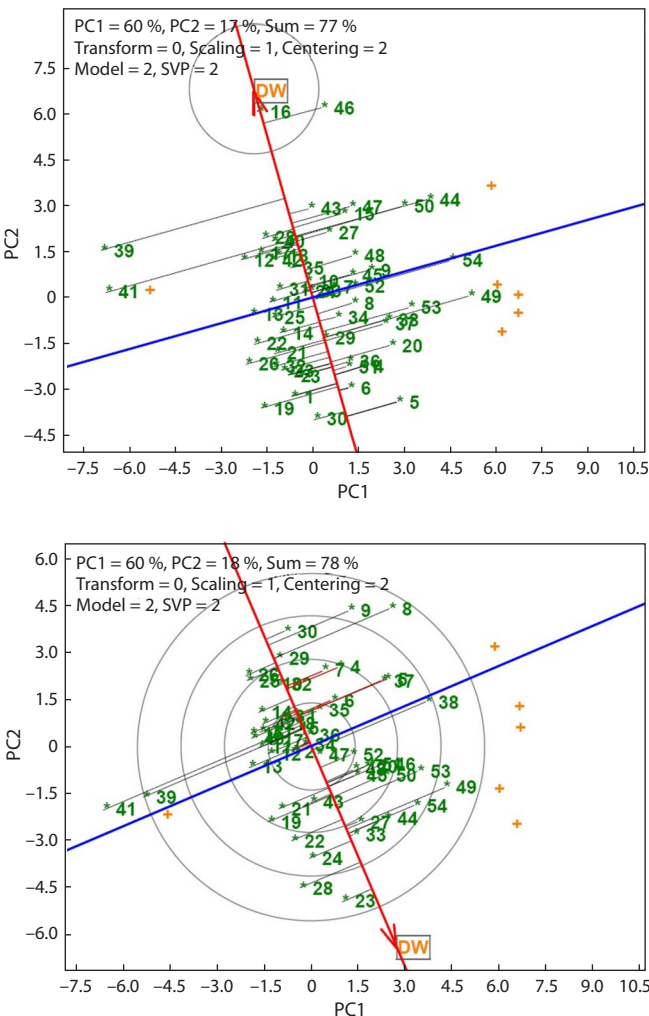


**Fig. 4.** The perfect trait diagram showing position of the measured traits of sorrel in (upper panel) the first trial and (lower panel) the second trial.

and the axis of the average trait, smaller angles denoting greater typical potentials. Therefore, the traits with the smallest angles, such as lamina area (LA) and petiole diameter (PD), exhibit higher typical potential across both trials, while leaf dry weight (DW) had a larger angle with the axis, reflecting its lower typical potential in both trials.

#### Analysis of leaf dry weight

Figure 5 shows leaf dry weight (DW) along the horizontal axis, with distances from the axis reflecting variability among genotypes relative to the mean. Although accessions with the highest DW can be directly seen in Figure 2, Figure 5 highlights both mean performance and stability, assisting breeders in selecting genotypes with high and consistent leaf yield for further evaluation. Genotypes 16 and 46 were the most desirable for DW performance in the first trial, while genotypes 5 and 30 were the least favorable ones (Fig. 5). Genotypes with above-average performance of DW are situated above the average axis. The distance of genotypes from the horizontal axis serves as an index of standard deviation, and smaller distances indicate lower variability, so they are preferred for



**Fig. 5.** Examination of leaf dry weight (DW) across sorrel genotypes in (upper panel) the first trial and (lower panel) the second trial.

selection. Consequently, genotype 16 was recommended due to its low variability in comparison to genotype 30 in the first trial. In contrast, some genotypes located farther from the horizontal axis, such as 44 and 50, exhibit high variabilities and are considered less desirable.

In the second trial, genotypes 23 and 28 were the most desirable for DW performance, while genotypes 9 and 30 were the least favorable ones (Fig. 5). The effectiveness of using this option for identifying favorable genotypes for target traits has been demonstrated in studies on sweet corn (Stansluos et al., 2023) and safflower (Ebrahimi et al., 2023).

Sorrel genotype evaluation is crucial for preventing erosion in plant materials and effectively managing genetic improvement tasks. This study revealed substantial variation in leaf morphological traits among the 54 sorrel genotypes. While taxonomic identification was not available for all accessions, the observed phenotypic diversity provides useful information for selecting superior genotypes and identifying traits for breeding programs. These results should be interpreted as intrasample variation rather than interspecific diversity.



The GTI biplot model revealed a relatively high level of variation (77 and 78 % for the first and second trials, respectively) and confirmed the presence of both simple and complex interactions among the genotypes and traits. Similar interaction patterns have been documented in other vegetable crops, such as spinach (Sabaghnia et al., 2015) and green bean (de Oliveira et al., 2018). These interactions resulted in varying rankings of genotypes across traits, making it challenging to select the most superior genotypes. Ignoring genotype  $\times$  trait interactions can complicate the selection process, because genetic differences among genotypes lead to varying performance across traits. The GTI highlights these differences, enabling breeders to select genotypes with consistently desirable trait profiles.

However, selection of high yielding genotypes needs genotypes with large lamina area, and it is similar in this respect to other leafy vegetable crops like spinach (Sabaghnia et al., 2013), so breeding for high leaf yield in sorrel should consider multiple traits, including lamina area, leaf number, and leaf dry weight (DW). Lamina area is particularly informative for selection because it moderately correlates with DW and can serve as a proxy at early steps of breeding. However, direct measurement of DW and consideration of leaf number are also important to ensure the development of high-yielding cultivars.

The GTI biplot proved effective for visualizing complex genotype  $\times$  trait interactions, allowing breeders to identify superior genotypes and key traits for leaf yield, because this visual tool facilitates practical decision-making in breeding programs, enabling the selection of genotypes with optimal combinations of traits. While the present study focused on morphological traits of leaves to assess genetic diversity and leaf yield performance, we acknowledge that biochemical characteristics such as oxalate content, antioxidant capacity, and contents of other secondary metabolites are also important for evaluating the nutritional and medicinal value of sorrel. Integrating these biochemical traits in future studies could provide a more comprehensive assessment of genotype performance, allowing breeders to select genotypes that combine high leaf yield with superior nutritional or medicinal qualities. Such combined morphological and biochemical evaluations would further enhance the practical utility of the GTI biplot method in sorrel breeding programs.

## Conclusions

The study demonstrates the practical utility of the GTI biplot for sorrel breeding. By identifying lamina area as a key trait and highlighting superior genotypes such as 16, 23, 28, 46, 44, and 50, breeders can optimize breeding strategies and efficiently raise high-yielding cultivars. The GTI biplot explained 77 and 78 % of the variation in the first and second trials, respectively, demonstrating its utility for evaluating multivariate morphological data. Lamina area and petiole diameter were identified as the most discriminative and typical traits across both trials, providing key selection criteria

for leaf yield improvement. However, for breeding programs aimed at industrial conditions, further evaluation in the field is recommended to ensure stability and performance in those target environments.

## References

- Bourang M.K., Hassandokht M., Nazeri V., Rasoulnia A., Moghanloo G.D. Morphological evaluation of genetic diversity of wild populations of some *Rumex* species in Iran. *Iran J Horticult Sci.* 2023;53(4): 823-836. doi 10.22059/ijhs.2020.305743.1819
- de Oliveira T.R.A., Gravina G.A., de Oliveira G.H.F., Araújo K.C., de Araújo L.C., Daher R.F., Vivas M., Gravina L.M., da Cruz D.P. The GT biplot analysis of green bean traits. *Ciênc Rural.* 2018; 48(6):e20170757. doi 10.1590/0103-8478cr20170757
- Ebrahimi H., Sabaghnia N., Javanmard A., Abbasi A. Genotype by trait biplot analysis of trait relations in safflower. *Agrotech Ind Crops.* 2023;3(2):67-73. doi 10.22126/atc.2023.8906.1086
- Li J.J., Li Y.X., Li N., Zhu H.T., Wang D., Zhang Y.J. The genus *Rumex* (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Nat Prod Bioprospect.* 2022;12(1):21. doi 10.1007/s13659-022-00346-z
- Mohebodini M., Ghanbari A., Sabaghnia N. Genetic diversity of *Rumex* spp. accessions according to morphological traits. *Iran J Biol.* 2020;33(2):396-407. doi 20.1001.1.23832592.1399.33.2.10.2
- Rahimi M., Asadi-Gharneh H.A., Sabaghnia N. Evaluation of some traits in local Iranian quince (*Cydonia oblonga* Miller) genotypes. *Int J Fruit Sci.* 2019;19(4):397-412. doi 10.1080/15538362.2018.1552231
- Sabaghnia N., Asadi-Gharneh H.A., Janmohammadi M. Sequential path analysis of spinach yield using several quantitative and qualitative traits. *Nat Montenegrina.* 2013;12(1):205-216
- Sabaghnia N., Behtash F., Janmohammadi M. Graphic analysis of trait relations of spinach (*Spinacia oleracea* L.) landraces using the biplot method. *Acta Univ Agric Silv Mendelianae Brun.* 2015;63(4): 1187-1194. doi 10.11118/actaun201563041187
- Sabaghnia N., Yousefzadeh S., Janmohammadi M. Graphical evaluation of genetic diversity among some genotypes of *Lepidium sativum* L. using morphological traits. *Taxon Biosyst.* 2023;15:43-54. doi 10.22108/tbj.2024.139710.1243
- Shahla S., Maasoumi A.A., Hamd S.M.M., Mehregan I., Nejadstarrati T. Fruit morphology of the genus *Rumex* L. (Polygonaceae) in Iran. *J Biodivers Environ Sci.* 2014;5(1):655-663
- Shukla S., Upadhyay K.K., Mishra B.K. Genetic relationship between foliage yield and its biochemical components in vegetable amaranth. *Int J Veg Sci.* 2016;22(4):322-332. doi 10.1080/19315260.2015.1042994
- Stansluos A.A.L., Öztürk A., Niedbała G., Türkoğlu A., Haliloğlu K., Szulc P., Omrani A., Wojciechowski T., Piekutowska M. Genotype-trait (GT) biplot analysis for yield and quality stability in some sweet corn (*Zea mays* L. *saccharata* Sturt.) genotypes. *Agronomy.* 2023;13(6):1538. doi 10.3390/agronomy13061538
- Vasas A., Orbán-Gyapai O., Hohmann J. The genus *Rumex*: review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2015;175:198-228. doi 10.1016/j.jep.2015.09.001
- Xu N., Fok M., Li J., Yang X., Yan W. Optimization of cotton variety registration criteria aided with a genotype-by-trait biplot analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):17237. doi 10.1038/s41598-017-17631-4
- Yan W. Two types of biplots to integrate multi-trial and multi-trait information for genotype selection. *Crop Sci.* 2024;64(3):1608-1618. doi 10.1002/csc2.21231
- Yan W., Fréreau-Reid J. Genotype by yield\*trait (GYT) biplot: a novel approach for genotype selection based on multiple traits. *Sci Rep.* 2018;8(1):8242. doi 10.1038/s41598-018-26688-8

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

Received November 26, 2025. Revised June 16, 2026. Accepted June 16, 2026.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>  
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)»  
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/  
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМЭ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Белый список (уровень 1), Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:  
русскоязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>  
и платформе Научной электронной библиотеки, [elibrary.ru/title\\_about.asp?id=32440](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=32440)  
англоязычная версия – на сайте [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour)  
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: [vavilov\\_journal@bionet.nsc.ru](mailto:vavilov_journal@bionet.nsc.ru)

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук»,  
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963\*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....  
Дата выхода в свет 06.10.2026. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 19.1.  
.....

