

Том 60, Номер 1

ISSN 0016-6758

Январь 2024



# ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 60, номер 1, 2024

---

---

## Обзорные и теоретические статьи

- Современное состояние исследований экспрессии генов *in situ* в тканях животных  
*М. В. Бытов, В. Д. Зубарева, С. В. Вольская, С. Л. Хацко, И. А. Шкуратова, О. В. Соколова* 3
- Роль изменений в структуре и динамике хроматина при COVID-19  
*А. Е. Бигильдеев, В. И. Алексеев, А. К. Грибкова, Г. С. Тимохин, Г. А. Комарова, А. К. Шайтан* 16
- Сфера компетенции генов менделевских кардиомиопатий  
*А. Н. Кучер, М. С. Назаренко* 42
- 

## Общая генетика

- Анализ изменчивости генома *Escherichia coli* при воздействии ионизирующего излучения  
*М. Ю. Галлямова, К. Н. Вагин, Н. М. Василевский, Н. И. Хаммадов* 62
- 

## Генетика растений

- Генетическая дифференциация и клональность в локальной популяции кавказского эндемика *Trifolium polyphyllum* С.А. Меу. (Fabaceae)  
*О. Б. Зеленова, М. А. Галкина, В. Г. Онипченко, И. А. Шанцер* 69
- 

## Генетика животных

- Популяции тувинских короткожирнохвостых овец в структуре генофонда пород овец Российской Федерации  
*С. В. Бекетов, Т. Е. Денискова, А. В. Доцев, Э. А. Николаева, Н. А. Зиновьева, М. И. Селионова, Ю. А. Столповский* 80
- 

## Краткие сообщения

- Генетическая структура доместцированных популяций северного оленя (*Rangifer tarandus*) Среднесибирского плоскогорья и прилегающих территорий  
*С. Н. Каптанов, Е. С. Захаров, М. Т. Семина, Н. В. Винокуров, А. В. Винокуров, А. А. Онохов, П. А. Филимонов, А. А. Южаков, О. К. Сергеева, М. М. Сомова, К. А. Лайшев, Ю. А. Столповский* 94
- Полногеномный анализ ассоциации риска развития параноидной шизофрении у русских: поиск генетических маркеров в хромосомной области 1q43  
*А. Э. Гареева* 100
- Новый генетический маркер риска параноидной шизофрении в хромосомной области 9q21.13 у татар: полногеномный анализ ассоциации  
*А. Э. Гареева* 106
- 
-

# Contents

---

---

## Contents Vol.60, No. 1, 2024

---

---

### Reviews and Theoretical Articles

- Current state of *in situ* gene expression studies in animal tissues  
*M. V. Bytov, V. D. Zubareva, S. V. Volskaya, S. L. Khatsko, I. A. Shkuratova, O. V. Sokolova* 3
- The role of changes in structure and dynamics of chromatin due to COVID-19  
*A. E. Bigildeev, V. I. Alekseev, A. K. Gribkova, G. S. Timokhin, G. A. Komarova, A. K. Shaytan* 16
- The scope of mendelian cardiomyopathies genes  
*A. N. Kucher, M. S. Nazarenko* 42

---

### Common articles

- Analysis of genome variability of *Escherichia coli* when exposed to ionizing radiation  
*M. Yu. Gallyamova, K. N. Vagin, N. M. Vasilevsky, N. I. Hammadov* 62

---

### Plant Genetics

- Genetic differentiation and clonality in a local population of the caucasian endemic *Trifolium polyphyllum* c. A. Mey. (Fabaceae)  
*O. B. Zelenova, M. A. Galkina, V. G. Onipchenko, I. A. Schanzer* 69

---

### Animal Genetics

- Populations of Tuvan shot-fat-tailed sheep in the structure of the gene pool of sheep breeds of the Russian Federation  
*S. V. Beketova, T. E. Deniskovab, A. V. Dotsevb, E. A. Nikolaeva, N. A. Zinovievab, M. I. Selionovac, Yu. A. Stolpovskya* 80

---

### Short Communications

- Genetic structure of domesticated reindeer (*Rangifer tarandus*) populations in the central Siberian plateau and adjacent areas  
*S. N. Kashanova, E. S. Zakharov, M. T. Semina, N. V. Vinokurovd, A. V. Vinokurove, A. A. Onokhova, P. A. Filimonova, E. A. Nikolaeva, A. A. Yuzhakovg, O. K. Sergeevaf, M. M. Somovaa, K. A. Laysheva, Yu. A. Stolpovsky* 94
- Genome-Wide analysis of the risk association for the development of paranoid schizophrenia in Russians: search for genetic markers in the 1q43 chromosomal region  
*A. E. Gareeva* 100
- Novel genetic risk marker for paranoid schizophrenia in the chromosomal region 9q21.13 in Tatars: a genome-wide association analysis  
*A. E. Gareeva* 106
- 
-

УДК 619:636.2:636.5:636.4:612

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *in situ* В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

М. В. Бытов<sup>1</sup>, В. Д. Зубарева<sup>1</sup>, С. В. Вольская<sup>1</sup>, С. Л. Хацко<sup>1, 2</sup>,  
И. А. Шкуратова<sup>1</sup>, О. В. Соколова<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,  
Екатеринбург, 620142 Россия

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 620026 Россия

\*e-mail: nauka\_sokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 08.08.2023 г.

Морфологические исследования сельскохозяйственных животных чаще всего проводятся с использованием простейших методик приготовления и окраски препаратов. Изучение процессов эмбриогенеза, постэмбриональных особенностей развития органов и тканей, эффекта влияния различных веществ с использованием гистохимических и иммуногистохимических методов окраски, а также с помощью гибридизации РНК *in situ* и секвенированием транскриптома *in situ* еще предстоит. Особенности протекания многих клеточных и тканевых процессов у крупного рогатого скота, свиней и кур в разрезе сравнительной физиологии еще не изучены. Высокая продуктивность сельскохозяйственных животных ассоциирована с интенсивным функционированием всех органов и систем организма. Влияние промышленного содержания сельскохозяйственных животных и его последствия на развитие организма в онтогенезе заслуживают отдельного направления исследований с точки зрения экспрессии генов *in situ*. Несмотря на стремительное развитие технологий секвенирования транскриптома, в результате использования которых открываются новые гены-кандидаты какого-либо процесса, гибридизация РНК *in situ* остается “золотым” стандартом для их валидации. В настоящем обзоре кратко представлены современные методики и их модификации для изучения экспрессии генов *in situ*. Методики изучения транскриптома, которые реализованы на крупном рогатом скоте, свиньях и курах в качестве модельных организмов, включают: гибридизацию РНК *in situ* с использованием ZZ-зондов, тирамид-сигнальную амплификацию, цепную реакцию гибридизации, дигоксигенин-меченные зонды, ОТ-ПЦР, секвенирование транскриптома единичных клеток, секвенирование РНК *in situ*. В настоящем обзоре рассмотрены результаты исследований на крупном рогатом скоте, свиньях и курах. Результаты исследований в данной области представляются актуальными для понимания особенностей механизмов адаптации на транскриптомном уровне у высокопродуктивных животных в условиях промышленного содержания для поиска новых маркеров ценных сельскохозяйственных признаков. Стоит отметить, что в современной отечественной и зарубежной литературе крайне мало исследований с помощью гибридизации РНК *in situ*, несмотря на доступность и простоту метода.

**Ключевые слова:** гибридизация *in situ*, крупный рогатый скот, куры, свиньи, экспрессия генов, гистология, морфология, физиология.

DOI: 10.31857/S0016675824010011

Молекулярно-генетические методы исследований, в том числе такие как транскриптомные, нашли широкое применение не только в медицине, но и в ветеринарии, где полученные результаты послужили основой для понимания клеточных процессов у сельскохозяйственных животных [1–3]. Существует широкий спектр методов с разной степенью сложности выполнения, с разной производительностью и стоимостью анализа. В настоящее время RNA-seq обладает достаточной разрешающей способностью, благодаря которой можно исследовать транскриптомные различия и изменения на

уровне популяций клеток. Однако RNA-seq не позволяет изучить изменения транскриптома единичных клеток. Для данных целей используется группа методов под общим названием scRNA-seq (single-cell RNA sequencing) [4–8]. Эти методы являются дорогостоящими, требуют высокой квалификации сотрудников лабораторий в области молекулярных технологий и биоинформатики. Более того, они не позволяют изучить популяции клеток и единичные клетки в пространстве по отношению друг к другу, что ведет к потере морфологического контекста клеточного транскриптома [9].

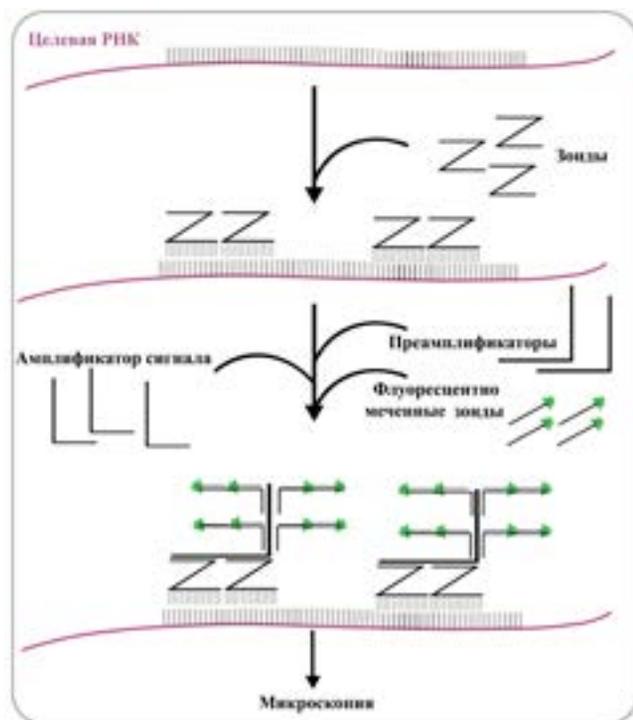


Рис. 1. Принцип работы технологии RNAscope, использующей ZZ-зонды.

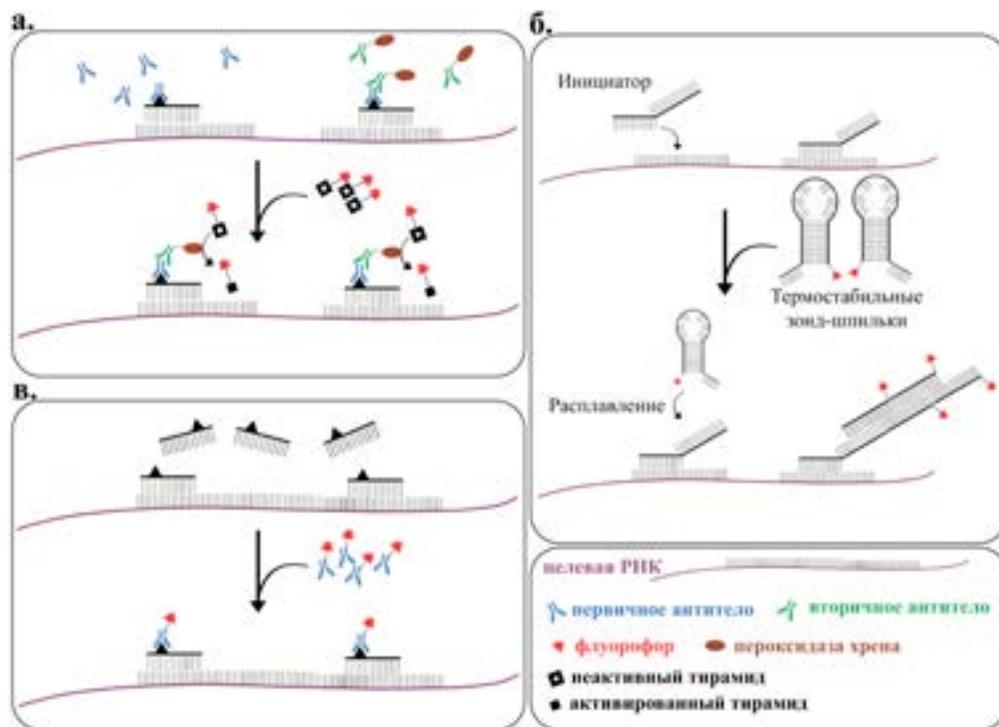
Гибридизация *in situ* (ISH) – это группа близких по технологии методов для детекции и визуализации специфичных последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) в срезах тканей, цитологических препаратах и целых организмах [10, 11]. Использование гибридизации *in situ* ДНК- и РНК-зондов с дальнейшей флуоресцентной микроскопией остается одним из наиболее востребованных и дешевых методов не только в рутинной клинической диагностике [12–15], но и в научных исследованиях [15, 16].

Изначально метод гибридизации РНК *in situ* (здесь и далее подразумевается изучение транскриптов *in situ*, а не использование конкретного типа зондов) проводился с использованием радиоактивно меченных зондов [17], однако в настоящее время для визуализации гибридизации чаще применяются флуоресцентно меченные зонды [10]. Доступны коммерческие наборы для FISH (fluorescent *in situ* hybridization) анализа РНК, разрабатываемые Advanced Cell Technology, Inc (США) по технологии RNAscope, и на сегодняшний день их используют в большинстве работ [18]. Среди лидеров по коммерческим наборам также можно выделить ViewRNA от Thermo Fisher Scientific (США) [19] и HuhuFISH от PixelBiotech (Германия) [20].

В основе разработанной в 2012 г. технологии RNAscope [18] лежат двойные Z-зонды, часть которых предназначена для гибридизации с РНК-мишенью, другая часть – для усиления сигнала, вызывая каскадную реакцию и сводя к минимуму нецелевые сигналы, что приводит к высокоспецифичному окрашиванию (Рис. 1). Стоит отметить, что сама структура ZZ-зондов и последовательности олигонуклеотидов, предоставляемых в наборе, остаются коммерческой тайной. Визуализация окрашивания проводится с помощью флуоресцентного микроскопа или лазерного конфокального микроскопа. В 2019 году максимальное количество одновременно обнаруживаемых РНК-мишеней было увеличено до 12 [21].

Существуют технологии амплификации сигнала с “открытым” принципом работы. Так, используются тирамид-сигнальная амплификация (Рис. 2, а) [22, 23], цепная реакция гибридизации *in situ* (Рис. 2, б) (hybridization chain reaction) [24], дигоксигенин-меченные зонды [25, 26] с последующей визуализацией флуоресцентно меченных антител к дигоксигенину (также и к другим гаптенам типа биотина) (Рис. 2, в) [27, 28]. Для каждого из этих методов проводятся постоянное усовершенствование и разработка новых протоколов, в том числе и мультиплексирования [29, 30]. Разработаны рекомендации по хранению биоматериала, подлежащего гибридизации РНК *in situ*, для получения достоверных результатов в ретроспективных исследованиях [31]. Несмотря на то что методы обладают отдельными модификациями, принцип работы – гибридизация нуклеиновых кислот – остается единым [11].

Стоит отметить, что несмотря на общий принцип связывания с таргетными последовательностями способов визуализации результатов гибридизации *in situ* большое множество. Так, если рассматривать технологии амплификации сигнала с “открытым” принципом работы, то тирамид-сигнальная амплификация требует использования модифицированных зондов, а также антител, связанных с компонентами протекания реакции. В большинстве случаев данная технология позволяет детектировать только один таргет за один анализ, а набор реагентов для протекания тирамидной реакции (без специфичного зонда) может быть использован в разных анализах. В свою очередь, цепная реакция гибридизации не требует никаких вспомогательных компонентов, кроме олигонуклеотидов: один из них таргет-специфичный с “хвостом”, а другие два мечены флюорофорами и амплифи-



**Рис. 2.** Технологии с “открытым” принципом работы: *a* – тирамид-сигнальная амплификация; *б* – цепная реакция гибридизации *in situ*; *в* – дигоксигенин-меченные зонды и флуоресцентно меченные антитела.

цируют сигнал. Это делает анализ более дешевым, позволяет его мультиплексировать, но при этом требует дизайна сложных олигонуклеотидов. Оценка транскриптов *in situ* при помощи зондов с дигоксигенином и другими гаптенами схожа по использованию антител для визуализации (возможно применение как флуоресцентной визуализации, так и с помощью пероксидазы хрена). Данные методы позволяют проводить как качественную, так и количественную оценку транскриптов *in situ*, однако количественная оценка требует модификаций изначальных методов исследования [24, 32].

Стоит отметить метод секвенирования, который позволяет извлечь максимальное количество информации о транскриптоме образца без потери морфологического контекста ткани – секвенирование транскрипта *in situ* [33–35]. Несмотря на то, что технология является передовой, для нее существует ряд значительных ограничений. Поле зрения, т.е. общий размер ткани, которую можно проанализировать в одном эксперименте, в значительной степени определяет масштаб исследования. Это может стать “бутылочным горлышком”, если необходимо профилировать крупные срезы. В то время как существуют коммерчески разрабатываемые ПО, учеными предпринимаются усилия по созданию

унифицированных вычислительных open-source программ, однако лаборатория, использующая секвенирование *in situ*, скорее всего столкнется с необходимостью создания собственного программного обеспечения для выполнения своих задач [36, 37]. Тип фиксации ткани для исследования также требует особого внимания: в большинстве случаев для секвенирования *in situ* подходят только свежемороженые ткани [21, 38].

Сопоставление результатов иммуногистохимических (ИГХ) исследований и гибридизации РНК *in situ* интуитивно, и уже были проведены исследования по сравнению чувствительности и точности этих методик. На клеточных культурах макрофагов из облученных радиацией мышц свиней изучена эффективность связывания антител с CD208 для проведения ИГХ. Исследователями показано, что использование разных антител против одного и того же антигена может привести к невоспроизводимым результатам. Напротив, изучение экспрессии генов с помощью DIG-зондов или цепной реакции гибридизации позволяет получить точные и воспроизводимые результаты [39]. Однако ИГХ и гибридизация РНК *in situ* не являются взаимозаменяемыми [40], поскольку в анализах используются разные молекулярные мишени. РНК FISH пока не может считаться “золотым стандартом”

в гистологических исследованиях ввиду малого количества научно-исследовательских работ с ее использованием [41].

Таким образом, существует разнообразие методов исследований РНК *in situ*: начиная от простой гибридизации на срезе и заканчивая секвенированием транскриптома *in situ*. Однако в настоящее время не все из них реализованы в исследованиях сельскохозяйственных животных, особенно это касается передовых технологий оценки транскриптома.

В настоящей работе представлен обзор научных исследований в области транскриптомики *in situ* у крупного рогатого скота, свиней и кур. Цель данного обзора – показать современное состояние исследований фундаментальных механизмов клеточной регуляции физиологических и патологических процессов у сельскохозяйственных животных. На сегодняшний день существует всего несколько научных направлений в области биологии сельскохозяйственных животных, в рамках которых используется гибридизация РНК *in situ*. Условно их можно разделить на работы по изучению физиологических процессов и исследования особенностей протекания патологического процесса.

Одно из несвязанных с инфекционным процессом направлений, в котором работает ряд коллективов ученых разных стран, применяя гибридизацию РНК *in situ*, состоит в изучении кишечника кур во время онтогенеза. В 2020 г. исследовано влияние отсроченного первого кормления (*delayed access to feed*, DAF) цыплят после вылупления. DAF влияет на массу тела и морфологию кишечника с более выраженным эффектом по мере увеличения его продолжительности. На молекулярном и морфологическом уровнях у цыплят из группы DAF наблюдалось подавление экспрессии мРНК *Muc2* и снижение количества бокаловидных клеток в верхней части ворсинок кишечника, в то время как экспрессия мРНК *PepT1* повышалась (*PepT1* – также известный как *SLC15A1* – кодирует белок, ответственный за всасывание ди- и трипептидов). Авторы делают предположение о том, что всасывание кишечником питательных веществ имеет приоритет над защитой организма во время DAF, что может сделать цыпленка более восприимчивым к патогенам в ранний период после вылупления [42]. Другим коллективом авторов были также изучены особенности экспрессии *Muc2*, но уже в контексте возрастных

изменений разных участков тонкого кишечника [43, 44]. Результаты их исследований дают основание предполагать, что при вылуплении цыплят двенадцатиперстная кишка уже обладает устойчивой популяцией бокаловидных клеток, тогда как популяции этих клеток в тощей и подвздошной кишках еще претерпевают изменения в период раннего онтогенеза. Авторы объясняют это тем, что двенадцатиперстная кишка является первым участком кишечника, который сталкивается с патогенами; таким образом, наличие хорошо развитой слизистой является необходимым условием для реализации барьерной функции кишечника цыплят. В 2021 г. было впервые проведено исследование эффекта жирных кислот на иммунные аспекты кишечника с помощью технологий RNAscope и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), что позволило детально изучить вопросы, касающиеся роли кислот в иммунной модуляции на тканевом и клеточном уровнях. Проведенное исследование на основе морфологических и транскриптомных результатов позволяет аргументировать подбор оптимальных кормовых добавок для здорового развития бройлеров [45].

Израильскими учеными проведена серия работ [46–48] по изучению влияния разных режимов кормления и составов рационов на развитие тонкого кишечника цыплят. В работах были использованы наборы RNAscope для флуоресцентной гибридизации РНК *in situ* *Lgr5* (как маркер стволовых клеток) и *PepT1* (как маркер энтероцитов, способных к абсорбции). В ИГХ исследованиях использованы следующие мишени: *Sox9* – как маркер прогениторных клеток; PCNA – как маркер пролиферирующих клеток. Был доказан положительный эффект кормления сразу после вылупления цыплят на созревание эпителиальных клеток [46]. Этой же группой ученых исследован пролиферативный эффект инъекций *in-ovo* растворами аминокислот на клетки тонкого кишечника. Несмотря на то что положительный эффект нивелировался после вылупления цыплят, как утверждают авторы, данное исследование является информативным для понимания влияния разных аминокислот на дифференциацию и пролиферацию прогениторных клеток кишечника [47]. На основании этих данных учеными были проведены дальнейшие исследования влияний *in ovo* инъекций растворов L-глутамин на развитие тонкого кишечника эмбрионов кур [48], в том числе и на экспрессию гена *LGR5* (маркера стволовых клеток кишечника), для которого детекция с помощью

RNAscore ранее была продемонстрирована [49]. Стимуляция L-глутамином повышала экспрессию мРНК переносчиков питательных веществ PerT-1 и SGLT-1 и белков плотных контактов TJP-1 и TJP-2 до и после вылупления цыплят. Поскольку сигналинг глюкагоноподобного белка-2 от кишечных эндокринных L-клеток связан с развитием и функционированием энтероцитов, был исследован эффект стимуляции глутамина на экспрессию мРНК ключевых гормонов и рецепторов в рамках этого энтероэндокринного пути и было обнаружено значительное увеличение экспрессии *GLP-2R* (кодирует рецептор глюкагоноподобного белка-2), *IGF-1* и *IGF-1R* (кодируют инсулиноподобный фактор роста-1 и его рецептор соответственно) до и после вылупления цыплят [49].

Работ по другим направлениям исследований, несвязанных с инфекционным процессом и объединенных одной темой, крайне мало. В 2020 г. китайскими учеными проведено секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq) с целью обнаружить новые гены-маркеры внутримышечных адипоцитов. Кластеризация единичных клеток по транскриптомам показала наличие обособленного кластера с высоким уровнем экспрессии гена *ADIPOQ*, на основании чего был сделан вывод о том, что это кластер *ADIPOQ*<sup>+</sup>-адипоцитов. В результате анализа исследователями обнаружены два новых гена-кандидата внутримышечных жировых клеток: *APOA1* и *COL1A1*. Для валидации маркеров использовали RNAscore, и таким образом была доказана специфичность двух новых биомаркеров для дальнейших исследований гетерогенной структуры мышц кур [50].

Методы гибридизации РНК *in situ* позволяют не только определять специфичный для конкретных популяций клеток профиль экспрессируемых генов, но и изучать сложные транскриптомные взаимодействия. Так, в 2019 г. китайскими исследователями доказано, что обнаруженная ими ранее *lncRNA* (длинная некодирующая РНК) *IMFNCR* является “губкой” для miR-128-3p и miR-27b-3p (miR – микроРНК), которые, в свою очередь, являются ингибиторами экспрессии *PPARG* (*PPARG* – гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, ключевой фактор транскрипции для регуляции липидного обмена и дифференциации преадипоцитов). Таким образом, с помощью набора детекции РНК *in situ* RiboBio (Guangzhou RiboBio Co., Китай) сделан вывод о том, что уровень экспрессии

*lncRNA IMFNCR* это маркер дифференциации преадипоцитов во внутримышечной жировой ткани [51], количество которой является показателем качества куриного мяса [52].

В производстве куриного мяса качество получаемой продукции является определяющим фактором эффективности производства. Например, существует такая проблема как синдром “деревянной грудки” – дефект качества мяса, наносящий экономический ущерб птицеводству [53, 54]. В 2019 г. была исследована взаимосвязь между изменениями в метаболизме липидов, появлением медленных изоформ миофибрилл в мышцах *Pectoralis major* у коммерческих цыплят-бройлеров с развитием “деревянной грудки”. С помощью гибридизации РНК *in situ* установлена повышенная экспрессия гена липопротеинлипазы в венозном русле пораженных цыплят. Повышенный уровень экспрессии данного фермента, в свою очередь, способствует повышенной проницаемости венозного эндотелия для свободных жирных кислот и остатков липопротеинов, что приводит к развитию очага лимфоцитарного флебита. Авторами тем же методом исследованы потенциальные гены-маркеры развития “деревянной грудки”, демонстрирующие повышенную экспрессию: *MYBPC1*, кодирующий миозин-связывающий белок С, участвующий в поддержании структуры саркомера, и *CSRП3*, белок которого играет роль в передаче механосенсорных сигналов. Однако более подробные исследования ассоциированных с этими маркерами процессов еще предстоит [55].

Проводимые исследования с использованием кур в качестве модельных объектов не ограничиваются работами по продуктивности [56, 57]. В 2016 г. европейскими учеными изучена зависимость пролиферации и дифференциации клеток головного мозга от экспрессии генов регуляторов обмена тиреоидных гормонов в развивающемся мозжечке эмбрионов кур [58]. В ряде работ показаны клеточные и тканевые паттерны экспрессии транспортеров и дейодиназ тиреоидных гормонов в мозжечке эмбрионов, а также общая картина зависимости развития от них у нескольких типов клеток (в том числе клеток Пуркинью) уже в раннем эмбриогенезе [58–60]. Изучены особенности развития ренин-ангиотензиновой системы во время эмбриогенеза и раннего постнатального онтогенеза цыплят. Показано, что ренин экспрессируется в ренальных и экстраренальных структурах, но с возрастом (30 дней после вылупления) обнаруживается только в юктагломерулярных

клеточных областях почек [26]. Эмбрионы кур являются удобным материалом для изучения процессов роста и развития разных тканей и органов, и протоколы для проведения более высокопроизводительных исследований продолжают разрабатываться. Так, была показана адаптация методики повышения оптической прозрачности тотальных препаратов эмбрионов кур с использованием мультиплексной иммуногистохимии и гибридации РНК *in situ* [61].

К сожалению, на сегодняшний день проведено мало работ по изучению пространственных транскриптомных особенностей других сельскохозяйственных животных.

Особенности транскриптомики отдельных клеток кишечника представляют интерес не только на курах в качестве модельного объекта. Проведенный в 2022 г. транскриптомный анализ с высоким разрешением показал транскрипционную изолированность для иммунных и эпителиальных клеток тонкого кишечника человека и свиньи [62]. Это первое исследование с помощью scRNA-seq, в котором выявлены транскрипционные различия между интраэпителиальными и субэпителиальными лимфоцитами у свиней. С использованием секвенирования транскриптома единичных клеток таких различий обнаружено не было, поскольку необходимо изолирование лимфоцитов разных слоев кожи [63]. Исследования по транскрипционным различиям интраэпителиальных и субэпителиальных лимфоцитов у свиней *in situ* с помощью методов гибридации РНК до сих пор не проведены.

В 2018 г. корейские ученые исследовали экспрессию генов, отвечающих за различные биологические процессы, специфичные для эндометрия, яичников и яйцеводов свиней. Были проведены секвенирование транскриптома и валидация результатов с помощью ОТ-ПЦР с последующей гибридацией РНК *in situ* для потенциальных биомаркеров тканеспецифичных процессов. В качестве таких маркеров были идентифицированы следующие гены: *CYP7A1*, *CYP17A1* и *CYP19A1*, обеспечивающие биосинтез стероидов и локализующиеся в тканях яичников; *PTGS2* и *PTGER2* – ассоциированы с метаболизмом эйкозаноидов, специфичных для тканей эндометрия. Отмечен высокий уровень экспрессии мРНК *CYP7A1* и *CYP19A1* в фолликулах яичников в клетках гранулезы, в то время как мРНК *CYP17A* экспрессируется в основном в тека-клетках яичников. Экспрессия данных

маркеров указывает на то, что стероидогенная активность в яичниках опосредована действием тека-клеток и клеток гранулезы. Уровни экспрессии мРНК *CYP17A1* и *CYP19A1* во время фазы проэструса были высокими. Экспрессия генов *PTGS2* и *PTGER2* в эндометрии обнаружена в эпителиальных и стромальных клетках с выраженной интенсивностью сигнала в фазе позднего диэструса и проэструса. Можно предположить, что действие простагландинов на эндометрий может иметь решающее значение для функции эндометрия и эстральной цикличности. Авторы считают, что дальнейшие исследования должны быть направлены на выяснение молекулярных функций данных генов для их дальнейшего использования в качестве молекулярных маркеров клеток и тканей [64].

Комплекс методов, включающий гибридацию РНК *in situ*, иммуногистохимию и радиоиммуноанализ, использован для изучения связи функций нейроэндокринной системы и фертильности молочных коров. Исследован уровень экспрессии мРНК гипоталамического нейропептида *Kiss1*, который стимулирует секрецию гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) и опосредует эффекты обратной связи половых стероидов на секрецию ГнРГ в дугообразном ядре гипоталамуса. Установлено, что снижение экспрессии *Kiss1* может являться фактором снижения фертильности коров [65].

В.Т. Mohammed и F.X. Donadeu с помощью гибридации РНК *in situ* изучили экспрессию miR-202 в клетках Сертоли и гоноцитах в семенниках быков. Результаты исследования показали изменения в экспрессии miR-202 на разных стадиях развития гоноцитов во время сперматогенеза. Уровень экспрессии miR-202 был выше в сперматогониях и первичных сперматоцитах, расположенных вблизи базального отдела семенных канальцев, по сравнению со вторичными сперматоцитами и сперматидами. Используя доступные базы данных о микроРНК, для miR-202 идентифицировано в общей сложности 466 предполагаемых генов-мишеней (в том числе мишень рапамицина – mTOR), что дает основания предполагать ключевую роль miR-202 в регуляции созревания и жизнеспособности гоноцитов в семенниках быков [66], а также ее роль в регуляции первого деления зиготы [67].

В 2020 г. китайскими учеными проведено комплексное исследование роли *lncRNA LncIMF4* во внутримышечном адипогенезе у преадипоци-

тов с использованием секвенирования транскриптома и гибридизации РНК *in situ*. Авторы утверждают, что нокдаун *LncIMF4* малой интерферирующей РНК стимулирует пролиферацию и дифференцировку внутримышечных адипоцитов свиней, поскольку происходит ослабление процессов аутофагии внутриклеточных липидов [68]. Сравнительные исследования энтеральной нервной системы человека и подсвинок с помощью секвенирования транскриптома позволили идентифицировать среди картированных клеток три основные нейрональные (холин-, NO- и глутаматергические) и две глиальные субпопуляции, их дискриминационные маркерные гены были валидизированы с помощью RNAscope [69].

В доступных источниках литературы не найдено комплексных работ с использованием методов гибридизации РНК *in situ*, посвященных изучению видовых транскриптомных различий сельскохозяйственных животных и птицы. Существуют работы, в которых изучены процессы, подробно описанные у других животных (например, крыс и мышей), а также атласы, посвященные изучению паттернов экспрессии эмбрионов мышей [70], все те же аспекты еще предстоит исследовать у продуктивных животных. Например, лептин и фактор некроза опухолей являются взаимосвязанными адипокинами, однако на основании полученных результатов по FISH-TSA картированию генов, ИГХ и ОТ-ПЦР в 2019 г. сделано предположение, что роль в качестве адипокина для фактора некроза опухолей может быть свойственна только млекопитающим [23]. Впервые в 2017 г. для кур были подробно изучены особенности экспрессии панкреатических полипептидов в зависимости от режима и рациона питания [71]. На сегодняшний день не существует исследований с использованием, например, одной группы генов в разрезе их пространственных особенностей расположения и клеточной принадлежности для разных видов животных. Известно только одно исследование различий в регуляции и организации внеклеточного матрикса (гиалуроновая кислота и коллаген) яичников крупного рогатого скота и свиней. Однако при проведении оценки уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе коллагена (*Col3a1*, *Colla1*), генов гиалуронидаз (*Hyal1*, *Hyal2*, *Tmem2* и *Kiaa1199*) и синтаз гиалуронана (*Has1*, *Has2*, *Has3*), как утверждают сами авторы, экспериментальная выборка была слишком мала, чтобы сделать окончательные выводы об их свойствах, а РНК FISH для одной из гиалуронидаз был проведен только на мышах [72].

Только в 2019 г. изучены особенности пространственной экспрессии гена лептина и его рецепторов в коже крупного рогатого скота. Показано, что адипоциты отсутствуют около волосяных фолликулов [73]. Напротив, в исследовании кожи собак обнаружена экспрессия молекул лептина около волосяных фолликулов, а также рецепторов лептина на клетках сальных желез [74], что свидетельствует о морфологических различиях в структуре волосистой части кожи разных видов. Уже известно, что у человека белая жировая ткань кожи играет паракринную роль в росте и развитии волосяных фолликулов, однако некоторые механизмы путей этого сигналинга не изучены. Например, как адипокины влияют на секретиремый кожей белой жировой тканью фактор роста гепатоцитов, который, в конечном счете, оказывает влияние на рост волосяных фолликулов [75]. Учитывая транскриптомные различия в структуре тканей кожи разных видов, имеются основания предполагать отсутствие паракринного контроля адипозной тканью развития волосяных фолликулов у крупного рогатого скота.

Одним из перспективных направлений использования гибридизации РНК *in situ* является изучение пространственной экспрессии генов для понимания процессов структурно-функциональной дегенерации тканей [76], испытывающих нагрузку при метаболических дисбалансах, связанных с промышленным содержанием продуктивных животных. В данной области использование методов пространственной транскриптомики и метаболомики еще предстоит для ряда маркеров и процессов (инсулин-инсулиноподобный сигналинг, мишень рапамицина, сигнальные пути MAPK, сиртуины, рецепторы PPAR, бета-галактозидаза и другие) [77–80]. Такие исследования позволяют по-новому взглянуть на физиологические и патологические процессы метаболического старения тканей.

Еще одним методом исследования пространственной экспрессии генов является секвенирование РНК *in situ* [81–83]. В сельскохозяйственной биологии количество таких работ крайне мало. Группой исследователей из КНР проведено транскриптомное исследование мышечной и жировой ткани свиней. Использованы секвенирование транскриптома единичных клеток и анализ пространственной экспрессии с помощью Visium (10× Genomics Inc, США). Определены особенности миофибрилльного состава мышц. В результате работы охарактеризована транскриптомная изменчивость и идентифи-

цированы молекулярные механизмы, лежащие в основе экономически ценных признаков у свиней. Помимо новых, ранее неизученных транскриптов (в том числе транскриптов с неопределенным кодирующим потенциалом, микроРНК, кольцевых РНК, длинных некодирующих РНК), исследователями обнаружено, что более глубокие слои скелетной мышечной ткани (участвуют в поддержании положения тела), характеризующиеся быстрым окислительным метаболизмом, имели больше мРНК миофибрилл I типа по сравнению с поверхностными слоями (участвуют в быстрых движениях), которые содержат больше мРНК миофибрилл II типа [84]. В другом исследовании с помощью секвенирования транскриптома *in situ* (Visium, 10× Genomics Inc.), секвенирования единичных клеток и валидации генов-маркеров цепной реакцией гибридизации v3.0 [24] изучен эмбриогенез сердечной мышцы цыплят на нескольких сроках развития. Результаты комплексного подхода в секвенировании клеток были валидированы с помощью ИГХ и гибридизации РНК *in situ*, что позволило исследователям предположить участие клеток эпикардального происхождения в регуляции экспрессии ключевых генов белков внеклеточного матрикса, вовлеченных в миграции клеток [85].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время представлено ограниченное количество работ по исследованию экспрессии генов *in situ* не только в Российской Федерации, но и за рубежом. В отечественной ветеринарной медицине подобных работ не проводилось. В связи с этим большой объем фундаментальных знаний, полученный секвенированием транскриптома, остается невоспроизведенным с помощью гистологических методик. Такое последовательное комплексное воспроизведение результатов секвенирования реализуется, но недостаточно распространено.

К сожалению, на сегодняшний день проведено мало исследований по изучению пространственных транскриптомных особенностей сельскохозяйственных животных. Несмотря на разнообразие доступных технологий и их постоянное совершенствование, у свиней и крупного рогатого скота более детальные исследования экспрессии генов еще предстоят.

Также актуальным является изучение течения инфекционного процесса с точки зрения экс-

прессии генов противо- и провоспалительных маркеров в различных тканях.

Таким образом, представляется перспективной разработка отечественной технологии для оценки уровня экспрессии *in situ* с использованием гибридизационных зондов по технологии, принцип работы которой находился бы в открытом доступе. На сегодняшний день подобные разработки с использованием новых доступных химических компонентов в России отсутствуют, как и коммерческие наборы для проведения данного анализа.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2022-0004 “Разработка технологии для маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота по генам, ассоциированным с устойчивостью к заболеваниям”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riollot C., Rainard P., Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection // *J. Dairy Sci.* 2001. V. 84. № 5. P. 1077–1084. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74568-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74568-7)
2. Kong R.S., Liang G., Chen Y. et al. Transcriptome profiling of the rumen epithelium of beef cattle differing in residual feed intake // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. Article ID 592. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2935-4>
3. Resnyk C.W., Chen C., Huang H. et al. RNA-Seq analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens highlights a divergence in expression of genes controlling adiposity, hemostasis, and lipid metabolism // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139549>
4. Li X., Wang C.Y. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing // *Int. J. Oral Sci.* 2021. V. 13. № 1. Article ID 36. <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00146-0>
5. Jovic D., Liang X., Zeng H. et al. Single-cell RNA sequencing technologies and appli-

- cations: A brief overview // *Clin. Transl. Med.* 2022. V. 12. № 3. Article ID e694. <https://doi.org/10.1002/ctm2.694>
6. *Hwang B., Lee J.H., Bang D.* Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 8. P. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
  7. *Wiarda J.E., Trachsel J.M., Sivasankaran S.K. et al.* Intestinal single-cell atlas reveals novel lymphocytes in pigs with similarities to human cells // *Life Sci. Alliance*. 2022. V. 5. № 10. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201442>
  8. *Junhong W., Mingyang C., Ming G. et al.* Single-cell transcriptional analysis of lamina propria lymphocytes in the jejunum reveals ILC-like cells in pigs // *bioRxiv*. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.01.01.522424>
  9. *Eng C.L., Lawson M., Zhu Q. et al.* Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH // *Nature*. 2019. V. 568. № 7751. P. 235–239. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1049-y>
  10. *Cassidy A., Jones J.* Developments in situ hybridisation // *Methods*. 2014. V. 70. № 1. P. 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.006>
  11. *Young A.P., Jackson D.J., Wyeth R.C.* A technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization // *PeerJ*. 2020. V. 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.8806>
  12. *Weise A., Liehr T.* Rapid prenatal aneuploid screening by fluorescence in situ hybridization (FISH) // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1885. P. 129–137. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1_9)
  13. *Prudent E., Raoult D.* Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2019. V. 43. № 1. P. 88–107. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy040>
  14. *O'Connor S.J.M., Turner K.R., Barrans S.L.* Practical application of fluorescent in situ hybridization techniques in clinical diagnostic laboratories // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2148. P. 35–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0_3)
  15. *Chrzanowska N.M., Kowalewski J., Lewandowska M.A.* Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnosis and tailored therapies in solid tumors // *Molecules*. 2020. V. 25. № 8. <https://doi.org/10.3390/molecules25081864>
  16. *Zirker A., Papantonis A.* Detecting circular RNAs by RNA fluorescence in situ hybridization // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1724. P. 69–75. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7562-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7562-4_6)
  17. *Uhl G.R.* In situ hybridization: quantitation using radiolabeled hybridization probes // *Methods Enzymol.* 1989. V. 168. P. 741–752. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)68055-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)68055-x)
  18. *Wang F., Flanagan J., Su N. et al.* RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues // *J. Mol. Diagn.* 2012. V. 14. № 1. P. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmol dx.2011.08.002>
  19. *Itzkovitz S., van Oudenaarden A.* Validating transcripts with probes and imaging technology // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 4. P. S12–S19. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1573>
  20. *Kang H., Sheng L., Yongsheng C.* HuluFISH non-denaturing in situ detection of genomic DNA opened by CRISPR-Cas9 Nickase and Exonuclease // *bioRxiv*. 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.12.23.473974>
  21. *Asp M., Bergensträhle J., Lundeberg J.* Spatially resolved transcriptomes – next generation tools for tissue exploration // *BioEssays*. 2020. V. 42. № 10. <https://doi.org/10.1002/bies.201900221>
  22. *Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P.* Tyramide signal amplification for DNA and mRNA in situ hybridization // *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 326. P. 33–60. <https://doi.org/10.1385/1-59745-007-3:33>
  23. *Seroussi E., Knytl M., Pitel F. et al.* Avian expression patterns and genomic mapping implicate leptin in digestion and TNF in immunity, suggesting that their interacting adipokine role has been acquired only in mammals // *Intern. J. Mol. Sciences*. 2019. V. 20. № 18. <https://doi.org/10.3390/ijms20184489>
  24. *Choi H.M.T., Schwarzkopf M., Fornace M.E. et al.* Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust // *Development*. 2018. V. 145. № 12. <https://doi.org/10.1242/dev.165753>
  25. *Jeong W., Bae H., Lim W. et al.* Dicer1, AGO3, and AGO4 microRNA machinery genes are differentially expressed in developing female reproductive organs and overexpressed in cancerous ovaries of chickens // *J. Animal Science*. 2017. V. 95. № 11. P. 4857–4868. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1846>
  26. *Hoy J., Nishimura H., Mehalic T. et al.* Ontogeny of renin gene expression in the chicken, *Gallus gallus* // *General and Comparative Endocrinology*. 2020. V. 296. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113533>
  27. *Ogata M., Hayashi G., Ichiu A. et al.* I-DNA-tagged fluorescence in situ hybridization for highly sensitive imaging of RNAs in single cells // *Organic & Biomol. Chemistry*. 2020. V. 18. № 40. P. 8084–8088. <https://doi.org/10.1039/d0ob01635g>
  28. *Veselinová D., Mašlanková J., Kalinová K. et al.* Selected in situ hybridization methods: principles and application // *Molecules*. 2021. V. 26. № 13. <https://doi.org/10.3390/molecules26133874>

29. *Schwarzkopf M., Choi H.M.T., Pierce N.A.* Multiplexed quantitative in situ hybridization for mammalian cells on a slide: qHCR and dHCR imaging (v3.0) // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2148. P. 143–156. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0_9)
30. *Tsuneoka Y., Funato H.* Modified in situ hybridization chain reaction using short hairpin DNAs // *Frontiers Mol. Neurosci.* 2020. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00075>
31. *Baena-Del Valle J.A., Zheng Q., Hicks J.L. et al.* Rapid loss of RNA detection by in situ hybridization in stored tissue blocks and preservation by cold storage of unstained slides // *Am. J. Clin. Pathology.* 2017. V. 148. № 5. P. 398–415. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqx094>
32. *Xiao L., Labaer J., Guo J.* Highly sensitive and multiplexed in situ RNA profiling with cleavable fluorescent tyramide // *Cells.* 2021. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061277>
33. *Alon S., Goodwin D.R., Sinha A. et al.* Expansion sequencing: Spatially precise in situ transcriptomics in intact biological systems // *Science.* 2021. V. 371. № 6528. <https://doi.org/10.1126/science.aax2656>
34. *Lee J.H., Daugharthy E.R., Scheiman J. et al.* Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues // *Nat. Protocols.* 2015. V. 10. № 3. P. 442–458. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.191>
35. *Payne A.C., Chiang Z.D., Reginato P.L. et al.* In situ genome sequencing resolves DNA sequence and structure in intact biological samples // *Science.* 2021. V. 371. № 6532. <https://doi.org/10.1126/science.aay3446>
36. *Kishi J.Y., Liu N., West E.R. et al.* Light-Seq: Light-directed in situ barcoding of biomolecules in fixed cells and tissues for spatially indexed sequencing // *Nat. Methods.* 2022. V. 19. № 11. P. 1393–1402. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01604-1>
37. *Pandit K., Petrescu J., Cuevas M. et al.* An open source toolkit for repurposing Illumina sequencing systems as versatile fluidics and imaging platforms // *Scientific Reports.* 2022. V. 12. № 1. Article ID 5081. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08740-w>
38. *Williams C.G., Lee H.J., Asatsuma T. et al.* An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research // *Genome Medicine.* 2022. V. 14. № 1. Article ID 68. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01075-1>
39. *Sicherre E., Favier A.L., Riccobono D., Nikovics K.* Non-specific binding, a limitation of the immunofluorescence method to study macrophages in situ // *Genes.* 2021. V. 12. № 5. <https://doi.org/10.3390/genes12050649>
40. *Skaugen J.M., Seethala R.R., Chiosea S.I. et al.* Evaluation of NR4A3 immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization and comparison with DOG1 IHC for FNA diagnosis of acinic cell carcinoma // *Cancer Cytopathology.* 2021. V. 129. № 2. P. 104–113. <https://doi.org/10.1002/cncy.22338>
41. *Atout S., Shurrab S., Loveridge C.* Evaluation of the suitability of RNAscope as a technique to measure gene expression in clinical diagnostics: a systematic review // *Mol. Diagn. Ther.* 2022. V. 26. № 1. P. 19–37. <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00570-2>
42. *Liu K., Jia M., Wong E.A.* Delayed access to feed affects broiler small intestinal morphology and goblet cell ontogeny // *Poult. Sci.* 2020. V. 99. № 11. P. 5275–5285. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.040>
43. *Reynolds K.L., Cloft S.E., Wong E.A.* Changes with age in density of goblet cells in the small intestine of broiler chicks // *Poult. Sci.* 2020. V. 99. № 5. P. 2342–2348. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.052>
44. *Cloft S.E., Uni Z., Wong E.A.* Profiling intestinal stem and proliferative cells in the small intestine of broiler chickens via in situ hybridization during the peri-hatch period // *Poult. Sci.* 2023. V. 102. № 4. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102495>
45. *Fries-Craft K.A., Meyer M.M., Lindblom S.C. et al.* Lipid source and peroxidation status alter immune cell recruitment in broiler chicken ileum // *J. Nutr.* 2021. V. 151. № 1. P. 223–234. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa356>
46. *Reicher N., Melkman-Zehavi T., Dayan J. et al.* It's all about timing: early feeding promotes intestinal maturation by shifting the ratios of specialized epithelial cells in chicks // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.596457>
47. *Reicher N., Melkman-Zehavi T., Dayan J. et al.* Nutritional stimulation by in-ovo feeding modulates cellular proliferation and differentiation in the small intestinal epithelium of chicks // *Anim. Nutr.* 2022. V. 8. № 1. P. 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.010>
48. *Reicher N., Melkman-Zehavi T., Dayan J. et al.* Intra-amniotic administration of l-glutamine promotes intestinal maturation and enteroendocrine stimulation in chick embryos // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. Article ID 2645. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06440-z>
49. *Zhang H., Wong E.A.* Identification of cells expressing OLFM4 and LGR5 mRNA by in situ hybridization in the yolk sac and small intestine of embryonic and early post-hatch chicks // *Poult. Sci.* 2018. V. 97. № 2. P. 628–633.

- <https://doi.org/10.3382/ps/pex328>
50. *Li J., Xing S., Zhao G. et al.* Identification of diverse cell populations in skeletal muscles and biomarkers for intramuscular fat of chicken by single-cell RNA sequencing // *BMC Genomics*. 2020. V. 21. № 1. Article ID 752. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07136-2>
51. *Zhang M., Li F., Sun J.W. et al.* LncRNA IM-FNCR promotes intramuscular adipocyte differentiation by sponging miR-128-3p and miR-27b-3p // *Front. Genet.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00042>
52. *Luo N., Shu J., Yuan X. et al.* Differential regulation of intramuscular fat and abdominal fat deposition in chickens // *BMC Genomics*. 2022. V. 23. № 1. Article ID 308. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08538-0>
53. *Liu J., Puolanne E., Schwartzkopf M. et al.* Altered sarcomeric structure and function in Woody Breast myopathy of avian pectoralis major muscle // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00287>
54. *Bordignon F., Xiccato G., Boskovic Cabrol M. et al.* Factors affecting breast myopathies in broiler chickens and quality of defective meat: a meta-analysis // *Front. Physiol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.933235>
55. *Papah M.B., Abasht B.* Dysregulation of lipid metabolism and appearance of slow myofiber-specific isoforms accompany the development of Wooden Breast myopathy in modern broiler chickens // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53728-8>
56. *Darras V.M.* Deiodinases: How nonmammalian research helped shape our present view // *Endocrinology*. 2021. V. 162. № 6. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab039>
57. *Too H.C., Shibata M., Yayota M. et al.* Expression of thyroid hormone regulator genes in the yolk sac membrane of the developing chicken embryo // *J. Reprod. Dev.* 2017. V. 63. № 5. P. 463–472. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-017>
58. *Delbaere J., Van Herck S.L., Bourgeois N.M. et al.* Mosaic expression of thyroid hormone regulatory genes defines cell type-specific dependency in the developing chicken cerebellum // *Cerebellum*. 2016. V. 15. № 6. P. 710–725. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0744-y>
59. *Darras V.M.* The role of maternal thyroid hormones in avian embryonic development // *Front. Endocrinol.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00066>
60. *Delbaere J., Vancamp P., Van Herck S.L. et al.* MCT8 deficiency in Purkinje cells disrupts embryonic chicken cerebellar development // *J. Endocrinol.* 2017. V. 232. № 2. P. 259–272. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0323>
61. *Morrison J.A., McKinney M.C., Kulesa P.M.* Resolving in vivo gene expression during collective cell migration using an integrated RNAscope, immunohistochemistry and tissue clearing method // *Mech. Dev.* 2017. V. 148. P. 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.06.004>
62. *Wiarda J.E., Loving C.L.* Intraepithelial lymphocytes in the pig intestine: T cell and innate lymphoid cell contributions to intestinal barrier immunity // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1048708>
63. *Wiarda J.E., Becker S.R., Sivasankaran S.K. et al.* Regional epithelial cell diversity in the small intestine of pigs // *J. Anim. Sci.* 2023. V. 101. <https://doi.org/10.1093/jas/skac318>
64. *Kim J.M., Park J.E., Yoo I. et al.* Integrated transcriptomes throughout swine oestrous cycle reveal dynamic changes in reproductive tissues interacting networks // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23655-1>
65. *Clarke I.J., Reed C.B., Burke C.R. et al.* Kiss1 expression in the hypothalamic arcuate nucleus is lower in dairy cows of reduced fertility // *Biol. Reprod.* 2022. V. 106. № 4. P. 802–813. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaob240>
66. *Mohammed B.T., Donadeu F.X.* Localization and in silico-based functional analysis of miR-202 in bull testis // *Reprod. Domest. Anim.* 2022. V. 57. № 9. P. 1082–1087. <https://doi.org/10.1111/rda.14159>
67. *Wang M., Du Y., Gao S. et al.* Sperm-borne miR-202 targets SEPT7 and regulates first cleavage of bovine embryos via cytoskeletal remodeling // *Development*. 2021. V. 148. № 5. <https://doi.org/10.1242/dev.189670>
68. *Sun Y., Cai R., Wang Y. et al.* A newly identified LncRNA LncIMF4 controls adipogenesis of porcine intramuscular preadipocyte through attenuating autophagy to inhibit lipolysis // *Animals*. 2020. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/ani10060926>
69. *Li T., Morselli M., Su T. et al.* Comparative transcriptomics reveals highly conserved regional programs between porcine and human colonic enteric nervous system // *Commun. Biol.* 2023. V. 6. № 1. Article ID 98. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04478-x>
70. *Visel A., Thaller C., Eichele G.* GenePaint.org: An atlas of gene expression patterns in the mouse embryo // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. D552–D556. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh029>
71. *Reid A.M.A., Wilson P.W., Caughey S.D. et al.* Pancreatic PYY but not PPY expression is responsive to short-term nutritional state and the pancreas constitutes the major site of

- PYY mRNA expression in chickens // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017. V. 252. P. 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.002>
72. *Parkes W.S., Amargant F., Zhou L.T. et al.* Hyaluronan and collagen are prominent extracellular matrix components in bovine and porcine ovaries // *Genes.* 2021. V. 12. № 8. <https://doi.org/10.3390/genes12081186>
  73. *Mercati F., Dall'Aglio C., Timperi L. et al.* Epithelial expression of the hormone leptin by bovine skin // *Eur. J. Histochem.* 2019. V. 63. № 1. <https://doi.org/10.4081/ejh.2019.2993>
  74. *Bremont T., Cossec C., Roux C. et al.* Expression of three adipokines (adiponectin, leptin and resistin) in normal canine skin: a pilot study // *J. Comp. Pathol.* 2019. V. 167. P. 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.10.179>
  75. *Nicu C., O'Sullivan J.D.B., Ramos R. et al.* Dermal adipose tissue secretes hgf to promote human hair growth and pigmentation // *J. Invest. Dermatol.* 2021. V. 141. № 7. P. 1633–1645. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.12.019>
  76. *Wasserfall C., Nick H.S., Campbell-Thompson M. et al.* Persistence of pancreatic insulin mrna expression and proinsulin protein in type 1 diabetes pancreata // *Cell Metab.* 2017. V. 26. № 3. P. 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.013>
  77. *Amorim J.A., Coppotelli G., Rolo A.P. et al.* Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2022. V. 18. № 4. P. 243–258. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>
  78. *Sandhu B., Perez Matos M.C., Tran S. et al.* Quantitative digital pathology reveals association of cell-specific PNPLA3 transcription with NAFLD disease activity // *JHEP Rep.* 2019. V. 1. № 3. P. 199–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.05.007>
  79. *Kim H.J., Cheng P., Travisano S. et al.* Molecular mechanisms of coronary artery disease risk at the PDGFD locus // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36518-9>
  80. *Pedroza A.J., Tashima Y., Shad R. et al.* Single-cell transcriptomic profiling of vascular smooth muscle cell phenotype modulation in marfan syndrome aortic aneurysm // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020. V. 40. № 9. P. 2195–2211. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314670>
  81. *Choe K., Pak U., Pang Y. et al.* Advances and challenges in spatial transcriptomics for developmental biology // *Biomolecules.* 2023. V. 13. № 1. <https://doi.org/10.3390/biom13010156>
  82. *Zhang L., Chen D., Song D. et al.* Clinical and translational values of spatial transcriptomics // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. V. 7. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00960-w>
  83. *Wirth J., Huber N., Yin K. et al.* Spatial transcriptomics using multiplexed deterministic barcoding in tissue // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37111-w>
  84. *Jin L., Tang Q., Hu S. et al.* A pig BodyMap transcriptome reveals diverse tissue physiologies and evolutionary dynamics of transcription // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23560-8>
  85. *Mantri M., Scuderi G.J., Abedini-Nassab R. et al.* Spatiotemporal single-cell RNA sequencing of developing chicken hearts identifies interplay between cellular differentiation and morphogenesis // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21892-z>

## CURRENT STATE OF *in situ* GENE EXPRESSION STUDIES IN ANIMAL TISSUES

M. V. Bytov<sup>1</sup>, V. D. Zubareva<sup>1</sup>, S. V. Volskaya<sup>1</sup>, S. L. Khatsko<sup>1,2</sup>, I. A. Shkuratova<sup>1</sup>, O. V. Sokolova<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 112a, Belinsky str., Ekaterinburg, 620142 Russia*

<sup>2</sup>*Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, 620026 Russia*

\**e-mail: nauka\_sokolova@mail.ru*

Morphological studies of farm animals are most often conducted using simple preparation and staining techniques. The study of the processes of embryogenesis, postembryonic features of the development of organs and tissues, as well as the effect of various substances remains to be elucidated not only using histochemical and immunohistochemical staining methods, but also using RNA *in situ* hybridization and transcriptome *in situ* sequencing. Aspects of many cellular and tissue processes for cattle, pigs and chickens in the context of comparative physiology have not yet been studied. The high productivity of farm animals is associated with the intensive functioning of all organs and systems of the body. The influence of the agricultural management of farm animals and its consequences on the development of an organism in ontogeny deserve a separate area of research from the point of *in situ* gene expression. Despite rapid development of transcriptome sequencing technologies, which result in the discovery of new candidate genes for many processes, RNA *in situ* hybridization remains the gold standard for their validation. This review briefly presents modern techniques and their modifications for studying *in situ* gene expression. Transcriptome studies that have been implemented in cattle, pigs and chickens as model organisms include: *in situ* RNA hybridization using ZZ-probes, tyramide signal amplification, hybridization chain reaction, digoxigenin-labeled probes, RT-PCR, single cell transcriptome sequencing, *in situ* transcriptome sequencing. This paper is a review of the results of studies on cattle, pigs and chickens. The results of research in this area are relevant for understanding the features of adaptation mechanisms at the transcriptomic level in highly productive animals under industrial conditions in order to search for new markers of valuable agricultural traits. It should be noted that in literature there are very few studies using RNA *in situ* hybridization, despite the availability and simplicity of the method.

**Keywords:** *in situ* hybridization, cattle, chicken, pigs, gene expression, histology, morphology, physiology

УДК 578.24+577.2

## РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРЕ И ДИНАМИКЕ ХРОМАТИНА ПРИ COVID-19

А. Е. Бигильдеев<sup>1</sup>, В. И. Алексеев<sup>2</sup>, А. К. Грибкова<sup>2</sup>, Г. С. Тимохин<sup>3</sup>,  
Г. А. Комарова<sup>4</sup>, А. К. Шайтан<sup>2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва, 125167 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>3</sup>Высшая школа экономики, Международная лаборатория биоинформатики, факультет компьютерных наук,  
Москва, 109028 Россия

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: shaytan\_ak@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 16.08.2023 г.

Пандемия COVID-19 стала серьезным вызовом для систем здравоохранения и экономики многих государств, а понимание молекулярных механизмов патогенеза этого заболевания явилось значительным вызовом для современной науки. В то же время ученым впервые был доступен ряд высокоточных и высокопроизводительных методов анализа молекулярных процессов, включая технологии исследования изменений в хроматине на геномном уровне. В настоящем обзоре обсуждаются различные современные методы, которые применялись или могут быть применены для изучения изменений в структуре и динамике хроматина при инфицировании SARS-CoV-2, излагаются результаты имеющихся на данный момент исследований о роли этих изменений в патогенезе COVID-19 и в заключение рассматриваются известные на сегодняшний день молекулярные механизмы модуляции работы хроматина, возникающие при инфицировании SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** хроматин, COVID-19, SARS-CoV-2, эпигенетика, гистоны.

**DOI:** 10.31857/S0016675824010027

С начала пандемии COVID-19 в 2020 г. до июня 2023 г. было задокументировано более 766 миллионов случаев заболевания во всем мире [1], реальных случаев было как минимум в несколько раз больше [2]. Пандемия также стала стимулом для беспрецедентного всестороннего изучения механизмов инфицирования вирусом SARS-CoV-2, последующего развития болезни и ее последствий, в том числе на молекулярном уровне. Значительная часть исследований была посвящена изучению молекулярных механизмов взаимодействия вируса с поверхностью клетки, в том числе взаимодействию S-белка коронавируса с ACE2-рецепторами, участию мембранно-связанной сериновой протеазы TMPRSS2 в разрезании S-белка и последующей интернализации вируса [3]. Данные исследования во многом способствовали быстрому появлению вакцин от коронавирусной инфекции. Не менее важная, но отчасти более сложная, часть научных исследований связана с пониманием молекулярных процессов, происходящих после проникновения

вируса в клетку. В результате этих исследований стало понятно, что коронавирус существенным образом влияет на внутриклеточный метаболизм и сигнальные пути, изменяет внутриклеточный иммунный ответ и экспрессию генов [4]. Так, было показано, что через 1–5 ч после инфицирования до 90% РНК в клетке может составлять вирусная РНК [5]. Вирус может воздействовать на клетки, влияя на проницаемость мембраны для различных ионов, трансляцию белков, блокируя синтез генов, необходимых для функционирования митохондрий, а также воздействуя на различные эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов [5]. Роль эпигенетических механизмов в процессе развития вирусных инфекций становится фактором, значению которого уделяется все больше внимания как с точки зрения понимания механизмов развития инфекций и возникновения иммунного ответа, так и с точки зрения разработки возможных методов лекарственного воздействия [6, 7]. Исторически к эпигенетическим механизмам

регуляции экспрессии в первую очередь относят ДНК-метилирование. Однако эпигенетические механизмы выходят за пределы рассмотрения лишь ДНК-метилирования, они реализуются в хроматине в рамках динамических взаимодействий белков и ДНК, их химических модификаций. К эпигенетическим механизмам регуляции экспрессии, влияющим на структуру и функционирование хроматина, относятся также изменение доступности различных областей хроматина для взаимодействия с факторами транскрипции, пост-трансляционные модификации гистонов, вопросы трехмерной укладки хроматина, активности различных систем поддержания структуры хроматина, включая ремоделлеры хроматина и т.д. Изучение данных механизмов, выходящих за пределы лишь анализа ДНК-метилирования, стало возможным благодаря развитию новых современных методов исследований и является основным фокусом настоящего обзора.

В настоящем обзоре мы вначале обсудим различные современные методы, которые применялись или могут быть применены для изучения изменений в структуре и динамике хроматина при инфицировании SARS-CoV-2, затем будут рассмотрены результаты имеющихся на данный момент исследований о роли этих изменений в

патогенезе COVID-19, в заключение будут изложены известные на сегодняшний день молекулярные механизмы модуляции работы хроматина, возникающие при инфицировании SARS-CoV-2. Обсуждаемые в обзоре вопросы схематично проиллюстрированы на рис. 1.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ В ХРОМАТИНЕ, СВЯЗАННЫХ С COVID-19

#### Клеточные линии

С появлением SARS-CoV-2 ряд исследований был посвящен проверке восприимчивости широко используемых лабораторных клеточных линий к SARS-CoV-2 [8]. Среди этих линий выделяют несколько человеческих клеточных линий, которые используют для исследования механизмов заражения и репликации SARS-CoV-2. Клетки Calu-3 – клеточная линия аденокарциномы легких человека, выделенная в 1975 г. из плеврального выпота 25-летнего мужчины европеоидной расы [9]. Эта линия перmissive для SARS-CoV-2, она активно использовалась для скрининга потенциальных лекарственных препаратов против этого вируса [10]. Хотя SARS-CoV-2 в первую очередь поражает дыхательную систему, все больше данных свидетельствует

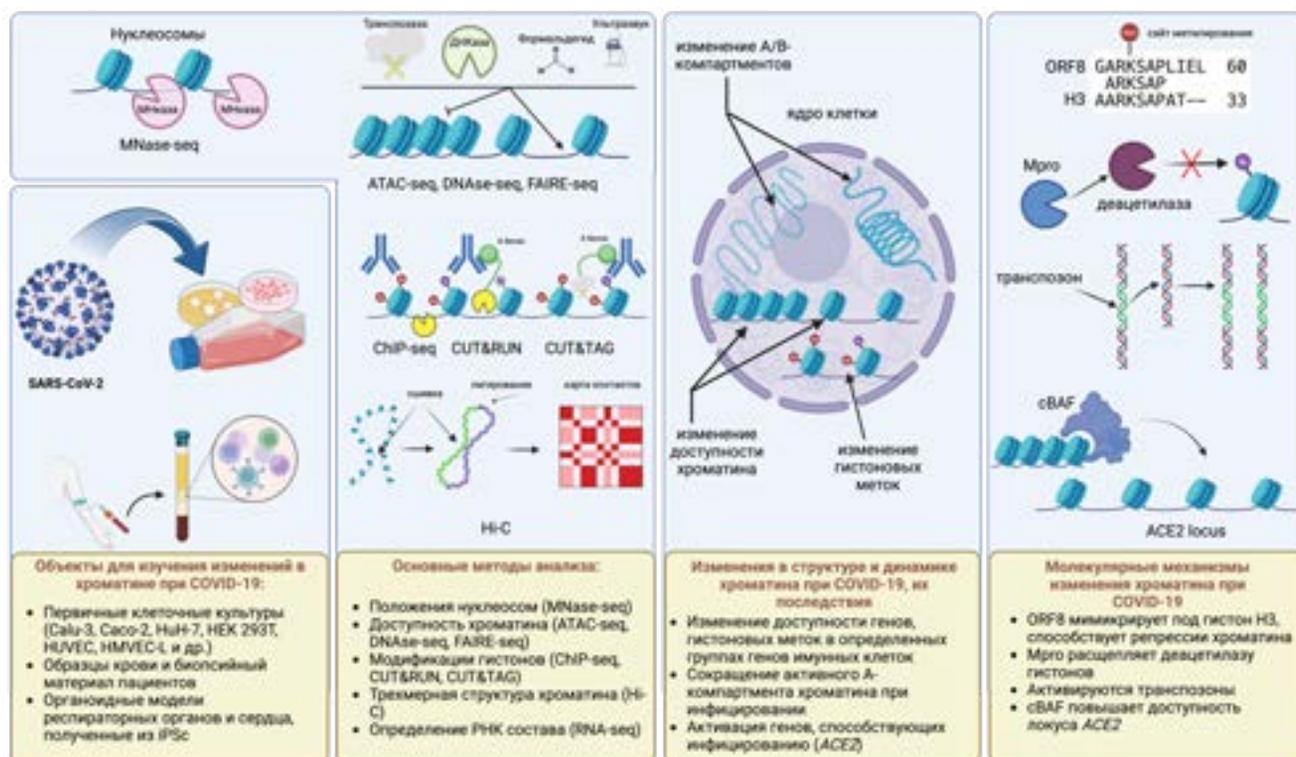


Рис. 1. Структура и динамика хроматина при COVID-19: объекты исследования, виды изменений и их эффекты. Создано с использованием BioRender.com.

о том, что этот вирус может иметь желудочно-кишечные проявления. Геном SARS-CoV-2 ранее был обнаружен в образцах слизистой желудка, прямой кишки и двенадцатиперстной кишки, а также в кале, что позволяет предположить, что пищеварительная система является потенциальным источником передачи вируса [11–13]. В качестве модели для изучения взаимодействия вируса с желудочно-кишечным трактом могут быть использованы клетки линии Сасо-2. Они были получены в 1977 г. из аденокарциномы толстой кишки, взятой у 72-летнего мужчины европеоидной расы, с использованием метода эксплантационной культуры [9] и широко использовались для изучения инфекции сначала SARS-CoV, а теперь SARS-CoV-2 [14, 15]. Эти клетки наряду с клетками Calu-3 стали основными клеточными линиями человека, изучаемыми в исследованиях *in vitro* SARS-CoV-2.

К иным клеточным линиям, используемым для исследований COVID-19, относятся HuH-7 и HEK 293T. Клеточная линия HuH-7 была создана из дифференцированного гепатоцита, полученного из клеточной линии клеток карциномы, первоначально изолированной из опухоли печени 57-летнего японца [16]. Хотя клетки HuH-7 перmissive к SARS-CoV-2, вирусная репликация в этих клетках считается умеренной [8]. Однако изучение SARS-CoV-2 на культуре клеток печеночного происхождения представляет особый интерес, поскольку печень была определена как один из основных органов-мишеней при COVID-19, а частота поражения печени у пациентов с COVID-19 составляет 14–53% [17, 18]. HEK 293T является модификацией линии клеток HEK 293, отличающейся от нее тем, что содержит термочувствительный мутантный Т-антиген вируса SV40, который позволяет эписомальную репликацию трансфицированных плазмид, содержащих начало репликации SV40 [19, 20]. Эта модификация сделала эти клетки особенно популярными для производства рекомбинантных белков и ретровирусов [21]. Клетки HEK 293, из которых были получены клетки HEK 293T, являются эпителиальными клетками почечного происхождения [22]. Клетки HEK 293T представляют ценным инструментом для исследований, оценивающих влияние экспрессии специфических белков на вирусную репликацию, поскольку эти клетки могут быть трансфицированы с высокой эффективностью и могут поддерживать продуктивную репликацию SARS-CoV-2. Одно из исследований, в котором оценивались противовирусные факторы рестрикции на различных

стадиях цикла репликации SARS-CoV-2, проводилось в клетках HEK 293T, трансдуцированных лентивирусами, несущими ген, ранее идентифицированный как потенциальный фактор рестрикции [23].

Существуют и другие клеточные линии, которые сами по себе не являются перmissive для инфицирования SARS-CoV-2, но генетически модифицируются для того, чтобы их заражение стало возможным или более эффективным. К таким линиям относятся, например, A549, HeLa [24, 25].

#### *Первичные клеточные культуры*

Недостатками описанных выше моделей является то, что все они – опухолевые клетки, которые не встречаются в норме в организме человека. Они могут служить удобными экспериментальными моделями, но не подходят для широкомасштабных популяционных исследований модификации хроматина при COVID-19. Для этих целей подходят первичные клетки, выделенные из различных органов и тканей людей, или первичные культуры клеток. Первичная культура клеток создается из растущих клеток, выделенных из ткани организма после ее механического или ферментативного разрушения [26]. Хотя эти клетки имеют короткий срок жизни, основным преимуществом первичных культур является сохранение генотипических и фенотипических характеристик клеток. Следовательно, они могут более точно, чем клеточные линии, отражать *in vitro* те процессы, которые происходят в дыхательных путях инфицированного человека. Например, первичные клеточные культуры использовались для изучения транскрипционного профиля клеток, инфицированных SARS-CoV-2. Особенно тщательно была исследована экспрессия цитокинов с целью лучшего понимания иммунной фазы и цитокинового шторма при COVID-19 [27, 28]. В силу того, что SARS-CoV-2 – респираторный вирус, при изучении процессов, происходящих после инфицирования, большое внимание было уделено эпителиальным клеткам дыхательных путей. Трахеобронхиальные эпителиальные клетки являются одной из первых мишеней для респираторных вирусов человека и могут культивироваться в воздушно-жидкостном интерфейсе (ВЖИ), где апикальная сторона клеточного слоя подвергается воздействию воздуха, а базальная сторона погружена в среду. Трахеобронхиальные клетки, культивируемые таким образом, образуют псевдостратифицированный

эпителиальный слой, который морфологически и функционально напоминает верхние проводящие дыхательные пути человека [29, 30]. После дифференцировки эти культуры содержат множество различных типов клеток, таких как базальные, реснитчатые и бокаловидные клетки. Они также вырабатывают защитную слизь, как и эпителий *in vivo* [31, 32]. Такие первичные культуры клеток эпителия дыхательных путей человека (human airway epithelium, HAE) получают из первичных бронхиальных эпителиальных клеток, выделенных из дыхательных путей доноров легких человека или пациентов, перенесших трансплантацию легких, и широко используются для изучения биологии респираторного эпителия [33]. Первичные бронхиальные эпителиальные клетки собираются с внутренней выстилки дыхательных путей и культивируются на пористых основаниях, первоначально погруженных в жидкую среду. После того, как клетки вырастают и образуют плотный монослой, среда удаляется с апикальной стороны, создавая культуру с интерфейсом воздух–жидкость. Затем первичные клетки размножаются и дифференцируются. Зрелые дифференцированные культуры HAE могут поддерживаться до двух месяцев и хорошо подходят для размножения широкого спектра возбудителей респираторных заболеваний человека [34]. Подобные культуры могут быть получены и из других отделов легких и в целом дыхательной системы человека [35]. Так, например, культуры альвеолярного эпителия, выращенные в условиях ВЖИ, также могут быть использованы для изучения взаимодействия вируса и клеток хозяина и особенно применимы, когда вирусная инфекция вызывает пневмонию и повреждение альвеол [36].

Первичные культуры HAE были использованы для выделения и обнаружения SARS-CoV-2 сразу после его появления в Ухане, Китай. Образцы бронхоальвеолярного лаважа от трех пациентов с неизвестной пневмонией были инокулированы в первичную культуру HAE [37]. Вирус был обнаружен с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и молекулярных методов для выявления генома коронавируса. Кроме того, культура HAE демонстрировала цитопатический эффект через 96 ч после инфицирования SARS-CoV-2, что было удобно для отбора инфицированных клеток [37].

В первичных назальных эпителиальных клетках человека (HNECs), выделенных из назальных биопсий нижней носовой раковины

здоровых доноров, подвергшихся операции по устранению искривления носовой перегородки, и эпителиальных клетках бронхов человека (HBECS) была продемонстрирована значительная экспрессия ACE2 и TMPRSS2 [28, 38]. Первичные эпителиальные клетки дыхательных путей трахеи человека (HtAECs) и эпителиальные клетки малых дыхательных путей человека (HsAECs), также растущие при ВЖИ, показали себя как SARS-CoV-2 перmissive клетки и показали устойчивое высвобождение вируса через апикальную сторону в течение более 14 дней после инфицирования [39]. Оба типа культур было предложено использовать для скрининга лекарственных препаратов в противовирусных испытаниях [39].

Первичные клетки, выделенные из дыхательных путей человека, и их культуры важны для понимания патофизиологических механизмов инфекции SARS-CoV-2, и именно на них получен большой объем информации. Их общим недостатком является то, что уровень экспрессии оцениваемых молекул, к которым относятся рецепторы для SARS-CoV-2, зависит от типа, функции и расположения эпителиальных клеток дыхательных путей. Они также различаются у разных хозяев в зависимости от возраста, пола и сопутствующих заболеваний [40].

Хотя первичные клетки, выделенные из дыхательных путей человека, и их культуры получили широкое распространение в исследованиях SARS-CoV-2, другие первичные культуры, такие как первичные эпителиальные клетки почек человека [41], первичные эпителиальные клетки глаза [42], человеческие клетки-предшественницы поджелудочной железы [43], также перmissive к SARS-CoV-2.

Многие исследования выявили тромботические и микрососудистые осложнения у умерших от COVID-19 пациентов, предполагая, что сосудистая патология является основной движущей силой тяжелого заболевания [44]. Несмотря на это, долгое время оставалось неясным, может ли SARS-CoV-2 непосредственно инфицировать эндотелий [45]. В недавно опубликованной работе для исследования этого вопроса применяли первичные культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и эндотелиальные клетки микрососудов человека из легкого (HMVEC-L) [46]. В работе было показано, что первичные эндотелиальные клетки экспрессируют низкие уровни ACE2 и TMPRSS2, и хотя

SARS-CoV-2 может проникать в эндотелиальные клетки при высоком титре вируса, эта инфекция не является продуктивной и вызывает апоптоз зараженных клеток. Однако после прямого или косвенного воздействия вируса в них развивается воспалительный ответ, характеризующийся повышенной секрецией цитокинов и экспрессией молекул адгезии. Это делает HUVEC и HMVEC-L пригодным *in vitro* инструментом для исследования процессов, связанных с реорганизацией хроматина, при инфекции SARS-CoV-2 и другими вирусами.

#### *Органоиды как модель исследования COVID-19*

У описанных клеточных моделей есть ряд недостатков. Так, большинство опухолевых клеточных линий человека несут мутации в онкогенах и онкосупрессорах (например, в гене *TP53*), что может влиять на репликацию вирусов [47]. Это вызывает озабоченность по поводу того, как эти линии раковых клеток воспроизводят вирусную биологию SARS-CoV-2 в нормальных, нетрансформированных клетках. Более того, некоторые клеточные линии (например, Huh7.5) имеют мутации в генах, контролируемых врожденный иммунный ответ, что может затруднять понимание противовирусных реакций и вирусного жизненного цикла. С другой стороны, получение первичных клеточных культур, как правило, связано с инвазивными операциями. Следовательно, актуален поиск иных моделей для изучения биологии вирусных инфекций, в частности SARS-CoV-2. Одним из таких подходов является использование органоидов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток. Суть подхода заключается в том, что можно взять плюрипотентные стволовые клетки, в том числе эмбриональные стволовые клетки (ESC) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs), и в определенных культуральных условиях получить органоиды – образования, состоящие из клеток различных зародышевых листков и различной степени зрелости, которые имеют элементы структуры и клеточный состав, напоминающий тот или иной орган [48]. Органоидные модели, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека, оказались мощным инструментом для моделирования инфекции SARS-CoV-2, изучения вирусного тропизма и ответа клеток хозяина, а также использовались для скрининга лекарств [49–53]. Ограничение органоидов, полученных из стволовых клеток, состоит в том, что они в основном содержат клетки не такие зрелые, как ткани взрослого человека. Кроме того, органоиды содержат множество

типов клеток, поэтому для анализа инфекции SARS-CoV-2 в таких органоидах целесообразно применять подходы, основанные на анализе единичных клеток, что требует значительных затрат и высокой квалификации исследователей как при подготовке библиотек, так и при биоинформатической обработке результатов.

#### *Клетки крови как объект исследования COVID-19*

С точки зрения анализа состояния хроматина в клетках пациентов с COVID-19 удобнее всего использовать образцы крови. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) человека, включая моноциты, В- и Т-лимфоциты [54, 55], перmissive к SARS-CoV-2. Любопытно отметить, что различные клеточные типы, входящие в состав МНПК, способны экспрессировать ACE2, основной мембранный белок-мишень SARS-CoV-2, на минимальном уровне [56, 57], и их инфицирование может происходить альтернативными путями, не затрагивающими эту молекулу [55]. Лейкоциты крови – перспективный объект исследования изменений хроматина при инфицировании человека SARS-CoV-2, поскольку, хотя они и не являются основной мишенью этого вируса, тем не менее могут быть заражены напрямую. Кроме того, изменения, происходящие в лейкоцитах, могут служить маркерами тех изменений, которые происходят в различных отделах организма, поскольку кровь омывает все органы и ткани и содержит иммунные клетки, функцией которых является ответ на инфекцию. Так, например, моноциты – одни из основных продуцентов воспалительных факторов, а В- и Т-лимфоциты – основные клетки адаптивного иммунитета, которые обеспечивают выработку вирус-специфичных антител и осуществляют лизис зараженных клеток соответственно.

Здесь стоит отметить, что в научной литературе встречаются работы, в которых объектами внимания при SARS-CoV-2 выступают различные клеточные популяции периферической крови. Так, например, есть работы, в которых ядра и ДНК выделяют из цельной крови. Для этого проводят осмотический лизис эритроцитов, добавляя к крови гипотонический раствор, после чего образец подвергают центрифугированию, добываясь осаждения клеток, и выделяют ядра или ДНК из всех ядросодержащих клеток крови одним из стандартных методов [58]. При таком способе пробоподготовки в рассмотрение попадают не только зрелые иммунные клетки крови, к которым относят гранулоциты, тучные клет-

ки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, натуральные киллеры и лимфоциты (В-клетки и Т-клетки) [59], но и другие клетки [60], которые могут циркулировать в периферическом русле, такие как кроветворные клетки-предшественницы различной степени созревания [61], включая эритробласты – незрелые эритроциты, содержащие ядро [62], мегакариоциты [63], эндотелиальные клетки [64], циркулирующие опухолевые клетки, если образец крови был получен от пациента, страдающего злокачественным новообразованием или лейкозом/лимфомой [65], фиброциты и другие [66, 67]. Список неиммунных клеток, циркулирующих в периферической крови, постоянно пополняется [60], и хотя относительное количество таких клеток невелико, их возможный вклад следует учитывать при проведении экспериментов с цельной кровью, особенно при различных патологических состояниях.

Для различных подходов к изучению хроматина целесообразно учитывать особенности анализа и выбирать соответствующие объекты исследования. Так, например, для ATAC-seq [68] лучше использовать не все ядродержащие клетки крови, а фракцию МНПК, в которой снижено содержание гранулоцитов, и в частности нейтрофилов. Активированные нейтрофилы могут участвовать в нетозе (NETosis) – процессе, в котором они формируют нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). НВЛ представляют собой комплексы белков и хроматина, которые могут задерживать патогены [69]. Во время нетоза хроматин набухает, деконденсируется и исторгается из нейтрофила [70]. В результате этого процесса образуются лизированные нейтрофильные клетки с большим количеством внеклеточного открытого хроматина. Наличие в исследуемых биологических образцах значительного количества активированных нейтрофилов может привести к большому количеству специфических для нейтрофилов фрагментов ДНК в конечной библиотеке, высокой доле коротких, защищенных мононуклеосомных фрагментов (хроматин НВЛ очень открыт и эффективно фрагментируется во время обработки ферментами) и к библиотекам с низкими целевыми показателями, поскольку фрагменты ДНК из НВЛ могут поступать из всех областей генома и не будут перекрываться с пиками из других клеток [71]. Для приготовления МНПК сначала из образца цельной крови удаляют эритроциты. Хотя эритроциты можно отделить от мононуклеарных клеток с помощью градиентного разделения по плотности, многие лаборатории предпочитают использовать мето-

ды лизиса посредством осмотического шока для удаления эритроцитов из различных образцов. Лизис происходит гораздо быстрее, чем градиентное разделение, и, как правило, оставляет оставшиеся популяции клеток относительно непо потревоженными. Кроме того, выход лейкоцитов из крови при лизисе эритроцитов намного выше, чем при градиентном разделении [72]. Далее в центрифужную пробирку помещается раствор с плотностью 1.077 г/мл, а сверху добавляется равный объем фосфатно-солевого буфера с ресуспендированными в нем клетками крови после процедуры лизиса эритроцитов. Образцы центрифугируются при 400 g в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее МНПК, находящиеся на границе раздела двух растворов, аккуратно отбираются пастеровской пипеткой в новую пробирку. Этот метод позволяет избавиться или значительно снизить содержание в образце гранулоцитов и эритроцитов [73]. Другим эффективным способом избавления от нежелательных в анализе клеточных популяций может служить негативная селекция нежелательной клеточной субпопуляции или выделение целевых клеток для анализа с помощью FACS или магнитной сепарации [74].

#### *Экспериментальные методы определения изменений в хроматине*

В ядре эукариотической клетки ДНК упакована в хроматин, элементарным строительным блоком которого является нуклеосома. Стабильность и компактизация нуклеосом регулируются совместными эффектами последовательности ДНК, вариантами гистонов и их посттрансляционными модификациями, АТФ-зависимыми белками-ремоделлерами нуклеосом и другими белками хроматина. Динамические посттрансляционные модификации гистонов, такие как метилирование, ацетилирование, убиквитинирование, сумоилирование и др., приводят к более или менее компактной структуре хроматина, которая влияет на экспрессию генов. На сегодняшний день в арсенале науки имеется спектр методов, позволяющих исследовать свойства хроматина, такие как позиции отдельных нуклеосом, области компактного или открытого хроматина, регионы ДНК, расположенные стерически рядом друг с другом и образующие функциональные кластеры, области ДНК, находящиеся в комплексе с ДНК-связывающими белками, регионы ДНК, связанные с белками-модификаторами хроматина. Ниже приведены некоторые распространенные методы анализа хроматина, и хотя сложно охватить весь спектр подобных методов,

который гораздо богаче приведенного здесь, многие важные результаты, в том числе в исследовании эффектов вирусных инфекций, получены этими методами.

#### *Метод MNase-seq*

Анализ хроматина с помощью микрококковой нуклеазы (МНКазы) является относительно простой процедурой для получения информации о расположении нуклеосом в нити ДНК. Метод основан на том, что ДНК, связанная с белками-гистонами, относительно нечувствительна к воздействию МНКазы. Инкубация ядер или пермеабелизованных клеток МНКазой в присутствии двухвалентных катионов индуцирует одонитевые, а затем и двунитевые разрывы в тех местах ДНК, которые не связаны с белками-гистонами [75]. Фермент также обладает экзонуклеазной активностью, поэтому после появления двунитевых разрывов ДНК расщепляется им до тех пор, пока фермент не достигнет защищенной ДНК, например в нуклеосоме. Обработка хроматиновых субстратов очень высокими концентрациями МНКазы приводит к образованию в основном моонуклеосомной ДНК, в то время как низкие концентрации фермента будут давать один двухцепочечный разрез на каждые 10–50 нуклеосом (в зависимости от точной концентрации). После обработки МНКазой оставшаяся защищенная ДНК может быть идентифицирована с помощью высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS), а полученные последовательности могут быть проанализированы с помощью соответствующих биоинформатических инструментов для получения данных о расположении нуклеосом в геноме *in vivo* [76]. У метода есть ряд особенностей. Важно точно определить количество фермента, поскольку слишком высокая активность приведет к полному расщеплению ДНК. Следовательно, необходимо выполнять титрование МНКазы, разделяя образец на несколько аликвот. Еще одна проблема, которую необходимо учитывать, заключается в наличии предпочтений определенных последовательностей ДНК при расщеплении МНКазой [77]. Чтобы преодолеть эту проблему, следует создавать “контрольный образец”, в котором воздействию МНКазы подвергается “голая” геномная ДНК, отделенная от всех белков-гистонов. Данные, полученные от такого образца, используются на этапе биоинформатического анализа для коррекции результатов [76].

#### *Метод DNase-seq*

Картирование гиперчувствительных сайтов ДНКазы I исторически является ценным инстру-

ментом для идентификации различных типов регуляторных элементов генов, включая промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы и области контроля локусов. Метод основан на том, что ДНКазы I эффективно фрагментируют участки ДНК, свободные от нуклеосом, в то время как участки ДНК, плотно связанные с белками-гистонами в составе нуклеосомы, и структуры конденсированного хроматина более высокого порядка более устойчивы к ее действию. Таким образом, этот подход позволяет идентифицировать области открытого эухроматина и области неактивного конденсированного хроматина [78]. Традиционный низкопроизводительный метод исследования структуры хроматина по идентификации гиперчувствительных сайтов ДНКазы I использует Саузерн-блот [79], более современный протокол позволяет производить картирование сайтов с помощью методов NGS [80]. Вкратце, клетки интереса подвергают лизису с помощью детергента, из них выделяют ядра, которые затем инкубируют в растворе с оптимальной концентрацией ДНКазы I. После обработки ДНКазой I достраивают концы полученных фрагментов до тупых с помощью ДНК-полимеразы бактериофага T4. Далее лигируют биотинилированные двухцепочечные адаптеры, содержащие последовательности, необходимые для последующих шагов (фрагментирования рестриктазой MmeI и ПЦР-амплификации библиотеки), с помощью ДНК-лигазы бактериофага T4. Избыток свободных адаптеров удаляют, проводя гель-электрофорез и вырезая фрагмент нужной длины. Полученные биотинилированные фрагменты инкубируют с рестриктазой MmeI для получения коротких фрагментов ДНК (адаптер плюс 20 оснований геномной ДНК), которые затем выделяют с помощью микросфер, покрытых стрептавидином. Далее лигируют второй адаптер по липким концам, оставшимся после MmeI, и производят ПЦР-амплификацию библиотеки, после чего библиотеку секвенируют одним из NGS-методов и картируют прочтения на соответствующий референсный геном. Недостатком этого метода является большое количество стартового материала (50 млн клеток), что не позволяет применять его для исследования редких клеточных популяций.

#### *Метод ATAC-seq*

Метод ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing), или основанный на секвенировании метод оценки доступных транспозазе областей хроматина, был предложен авторами в 2013 г. [68]. В основе

*Метод FAIRE*

метода лежит использование гиперактивной прокариотической транспозазы Tn5 [81], нагруженной адаптерами для высокопроизводительного секвенирования ДНК. Из целевых клеток выделяют ядра, а затем инкубируют их с транспозазой. Фермент одновременно разрезает ДНК и присоединяет адаптеры (процесс, который называется “тагментация” [82]). Таким образом, свободные участки ДНК оказываются эффективно фрагментированы и фланкированы сервисными последовательностями адаптеров. Далее происходят ПЦР-амплификация полученных фрагментов, секвенирование полученных библиотек одним из NGS-методов, картирование полученных прочтений на геном. При таком подходе области конденсированного хроматина, ДНК, связанная с гистонами в составе нуклеосом, и ДНК, связанная с факторами транскрипции, будут соответствовать областям с обедненным количеством прочтений. ATAC-seq – быстрый и чувствительный метод для интегративного эпигеномного анализа. Среди его преимуществ можно выделить: возможность анализировать небольшое количество стартового материала (от 500 до 50000 клеток), что позволяет исследовать первичные клетки, не прибегая к их предварительной экспансии и культивированию *in vitro*, которое может исказить картину активных областей хроматина, или исследовать малочисленные клеточные субпопуляции, например, специфические субпопуляции клеток крови или стволовые клетки; быстроту и относительную легкость подготовки библиотек ДНК для дальнейшего секвенирования (все процедуры от момента получения клеток до получения готовой библиотеки занимают 3 ч), что позволяет выполнять серийные измерения состояния хроматина у индивидуальных людей в сжатые временные сроки, например ограниченные клиническим течением того или иного заболевания; многомерность получаемых результатов, поскольку ATAC-seq дает информацию об областях открытого, доступного транспозазе хроматина, положении нуклеосом и областях ДНК, свободных от нуклеосом, областях связывания транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков. Информацию о доступности хроматина можно получить с помощью ATAC-seq не только по суммарной клеточной популяции, но и по отдельным клеткам. Для этого разработана модификация ATAC-seq, включающая выделение хроматина из каждой клетки (*singl cell ATAC-seq*, *scATAC-seq*) [83].

FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements), или выделение регуляторных элементов с помощью формальдегида, – это альтернативный подход к выявлению свободной от нуклеосом ДНК, гиперчувствительной к действию ДНКазы I и занятой транскрипционными факторами и другими регуляторными белками. Этот метод доказал свою успешность на множестве типов эукариотических клеток и тканей, его можно применять к одноклеточным суспензиям, прикрепленным клеточным культурам и образцам замороженной ткани [84]. Суть метода заключается в том, что клетки или диссоциированные ткани фиксируются на короткое время формальдегидом, лизируются и обрабатываются ультразвуком. Фрагментированный в результате этих воздействий хроматин подвергается экстракции фенолом/хлороформом. В результате этой процедуры ДНК, свободная от нуклеосом, оказывается в водной фазе, а ДНК, связанная с белками-гистонами, оказывается в фенольной фазе, поскольку обработка клеток формальдегидом образует ковалентные связи между молекулами белков и ДНК. Выделенная таким способом “голая” ДНК, обычно составляющая 1–3% генома, очищается и используется для картирования на референсный геном одним из методов, включая NGS-секвенирование. Важно отметить, что ДНК, выделенная этим методом, обогащена регуляторными элементами генов, что является результатом высокой эффективности сшивания формальдегидом гистоновых белков с ДНК, в отличие от более низкой эффективности сшивания специфических для последовательности белков с ДНК. Эта разница частично объясняется зависимостью эффективности реакции от расстояния между молекулами. Формальдегид – это небольшая молекула ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), и сшивки образуются только между белками и ДНК при их непосредственном контакте. В нуклеосоме существует приблизительно 10–15 взаимодействий гистон–ДНК, которые служат потенциальными местами сшивания [85]. Однако для большинства ДНК-связывающих белков существует гораздо меньше потенциальных мест сшивания. В среднем, сайты связывания таких белков составляют от 5 до 15 п. н. [86], причем лишь некоторые из них расположены достаточно близко к молекуле белка, так, что могут быть сшиты [87]. Кроме того, формальдегид требует наличия  $\epsilon$ -аминогруппы, как, например, на лизине, для образования сшивки [88, 89]. Приблизительно 10% аминокислотного состава гистонов составляют лизины [90], что гораздо выше, чем в среднем

у белков. Благодаря этим двум факторам нуклеосомы гораздо легче сшиваются с ДНК. Регуляторные элементы, обогащенные методом FAIRE, имеют высокое совпадение с теми, которые выявляются с помощью нуклеазной гиперчувствительности или иммунопреципитации хроматина (ChIP), а вся процедура может быть завершена за три дня [84, 91]. Этот метод обладает рядом преимуществ над традиционными методами DNase-seq, MNase-seq и ATAC-seq. FAIRE позволяет работать с прикрепленными клеточными культурами, фрагментами ткани, в том числе с фиксированными в формалине и заключенными в парафин блоками (FFPE), в то время как традиционные методы требуют выделения ядер из одноклеточной суспензии живых клеток. Кроме того, традиционные методы опираются на работу ферментов, что требует тщательного подбора их активности, а подход FAIRE не подразумевает участия ферментов.

*Иммунопреципитация хроматина (ChIP),  
методы CUT&RUN, CUT&TAG*

Методы картирования занятости транскрипционных факторов и картирования посттрансляционных модификаций белков-гистонов в геноме с помощью иммунопреципитации хроматина (Chromatin Immuno Precipitation, ChIP) были разработаны более двадцати лет назад. В ChIP факторы транскрипции, кофакторы или другие интересующие исследователя белки хроматина обогащаются путем иммунопреципитации вместе с ассоциированной с ними ДНК из предварительно обработанного хроматина. Участки геномной ДНК, обогащенные таким образом, первоначально определялись путем гибридизации ДНК на микрочипе (ChIP-chip) [92, 93] или с помощью количественной ПЦР [94], а в последующем – путем секвенирования ДНК методами NGS (ChIP-seq) [95–97]. В настоящее время ChIP-seq широко используется для изучения многих транскрипционных факторов, модификаций гистонов, хроматин-модифицирующих комплексов и других хроматин-ассоциированных белков в самых разных организмах. Широкое распространение этого метода привело к возникновению протоколов, различающихся деталями, поэтому консорциум ENCODE выпустил свое руководство, направленное на стандартизацию методов пробоподготовки и анализа результатов ChIP-seq [98]. При том, что на сегодняшний день существует много модификаций ChIP-seq, можно выделить два основных типа ChIP, различающихся, прежде всего, исходным препаратом хроматина. В первом

случае используется обратимо сшитый хроматин (XChIP), во втором, нативном ChIP (NChIP), используется нативный хроматин, обработанный путем инкубации с микрококковой нуклеазой. XChIP в основном подходит для картирования ДНК-мишеней транскрипционных факторов или других хроматин-ассоциированных белков [99], но также может применяться и для анализа модификаций белков-гистонов [100]. Агентом для обратимого сшивания может быть формальдегид [99] или ультрафиолетовый свет [101]. Далее сшитый хроматин фрагментируют с помощью ультразвука, получая фрагменты длиной от 300 до 1000 п. н. После этого комплексы белок–ДНК селективно иммунопреципитируют с использованием специфических антител к интересующему белку (белкам). Иммунопреципитированные комплексы затем собирают и промывают для удаления неспецифически связанного хроматина, а белки, связанные с ДНК, удаляют путем обработки протеиназой К. Очищенную ДНК идентифицируют с помощью ПЦР, микрочипов (ChIP-on-chip), молекулярного клонирования и секвенирования по Сэнгеру или прямого высокопроизводительного секвенирования (ChIP-seq). Нативный ChIP в основном подходит для картирования участков ДНК, связанных с белками-гистонами, несущими различные пост-трансляционные модификации. Поскольку ДНК обернута вокруг гистонов, образуя нуклеосомы, они естественным образом связаны между собой. Нативный хроматин расщепляют путем инкубации с микрококковой нуклеазой, которая расщепляет ДНК между нуклеосомами, оставляя нуклеосомы нетронутыми и предоставляя фрагменты ДНК длиной от одной нуклеосомы (147 п. н.) до пяти нуклеосом (735 п. н.). После этого используются методы, аналогичные XChIP, для очистки от клеточного дебриса, иммунопреципитации интересующего белка, удаления белка из иммунопреципитированного комплекса, очистки и анализа связанной с комплексом ДНК.

В последние годы было разработано два новых подхода к профилированию хроматина с использованием иммунопреципитации: CUT&RUN (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease) [102] и CUT&TAG (Cleavage Under Targets and Tagmentation) [103]. Основной принцип CUT&RUN заключается в том, что в отличие от ChIP-seq он не требует фрагментации и солиubilизации хроматина, а проводится *in situ*, что позволяет организовать количественное картирование хроматина в высоком разрешении

и при этом дает возможность провести исследование локального хроматинового окружения. Подобная точность действия обеспечивается использованием направляемой антителом микрорНК нуклеазы: антитело узнает транскрипционный фактор, ассоциированный с антителом посредством А-белка нуклеаза перерезает ДНК по обеим сторонам от фактора, высвобождая его и прикрепленный к нему участок ДНК в супернатант, откуда полученный фрагмент ДНК направится на парноконцевое секвенирование.

Метод CUT&TAG похож на CUT&RUN тем, что он проводится *in situ*, но привлекает вслед за антителом связанный с А-белком специфический фермент – Tn5-транспозазу (аналогичную той, что используется в методе ATAC-seq), активация которой приводит к генерации фрагментов библиотеки, соответствующих интересующим исследователя сайтам связывания транскрипционного фактора. Таким образом получается, что, в отличие от ChIP-seq и CUT&RUN, этот подход не требует подготовки библиотеки. Недостатком CUT&TAG является узость спектра его действия: на данный момент его протокол оптимизирован только для работы с пост-трансляционными модификациями и метод не выдает достоверных результатов для ассоциированных с хроматином белков.

В практическом плане данные методы отличаются от ChIP-seq тем, что требуют меньше клеток (в то время как ChIP-seq обычно требует более миллиона клеток, для успешного проведения CUT&RUN достаточно 500000, а нормальное количество клеток для CUT&TAG составляет всего 100000) [103, 104], осуществляются быстрее (выполнение всего протокола ChIP-seq обычно занимает около недели, в то время как проведение исследования по CUT&TAG и CUT&RUN длится, как правило, не более двух–трех дней), также эти новые подходы к профилированию хроматина требуют значительно меньшей глубины секвенирования при более высоком отношении сигнал/шум [105, 106].

#### *Методы изучения трехмерной структуры хроматина*

Для изучения трехмерной структуры хроматина в отношении ДНК–ДНК взаимодействий, – т. е. для исследования того, какие участки генома, как часто сближаются в пространстве клеточного ядра, был разработан ряд экспериментальных методов. До появления технологий секвенирования нового поколения (NGS) они в основном относились к электронной или опти-

ческой микроскопии [107], однако в 2002 г. был предложен молекулярно-биологический метод, позволявший определять, взаимодействуют ли в пространстве два заданных локуса генома [108]. Основная идея этого подхода заключается в том, что если два участка хроматина находятся достаточно близко друг к другу, то при добавлении формальдегида к образцу произойдет их сшивка, после чего можно будет последовательно обработать образец рестриктазами, чтобы хроматин распался на свободные фрагменты и сшитые формальдегидом пары, а затем лигазой, чтобы сшитые пары превратились в одиночные, гибридные молекулы ДНК. На заключительном этапе с помощью количественной ПЦР можно определить, образовались ли гибридные молекулы из интересующих их пар геномных участков и если да, то в каком объеме. Результаты ПЦР в таком случае позволяют судить о том, существует ли пространственное взаимодействие между двумя локусами (например, между промотором и энхансером) и насколько часто оно происходит. Так как материал для исследования получается из хроматина множества клеток, то результаты анализа носят статистический характер. Данный метод назвали chromosome conformation capture (метод захвата конформации хромосомы) или сокращенно – 3С. В последующие годы у него появились различные модификации, в результате чего о 3С стали говорить как о семействе методов. В 2006 г. был представлен метод 4С [109], позволяющий детектировать пространственные взаимодействия не между двумя заданными локусами, как в оригинальном 3С методе, а между одним выбранным участком и всеми остальными в геноме. Улучшение оригинального протокола достигалось за счет включения в него стадии инвертированной ПЦР, а использование ДНК-микрочипов позволяло достигать высокой производительности. В том же году была опубликована работа с описанием технологии 5С [110], которая позволяла определить взаимодействия между всеми участками некоторого региона генома за счет применения мультиплексной ПЦР.

Однако настоящий прорыв в области изучения трехмерной структуры хроматина немикроскопическими методами произошел из-за широкого распространения высокопроизводительного секвенирования – с его помощью удалось создать метод Hi-C [111], позволяющий измерять частоту пространственных взаимодействий между всеми участками генома, благодаря чему стало возможным создание полных карт его трехмерной организации и как следствие – по-

нимание фундаментальных принципов компактизации хроматина. Например, в работе, в которой был представлен метод Hi-C, с его помощью было впервые продемонстрировано присутствие в трехмерной структуре генома таких организационных паттернов, как А/В-компарменты и топологически ассоциированные домены, а кроме того найдены весомерные аргументы в пользу теории “фрактальной глобулы” как модели укладки хроматина.

Протокол Hi-C в общих чертах повторяет предшествующие методы семейства 3C: сначала образец обрабатывается формальдегидом, затем подвергается обработке рестриктазами, после идет этап добавления на сшитые фрагменты биотиновых меток, благодаря чему после этапа лигирования можно отделить полученные гибридные молекулы от остальных фрагментов, не нужных для данного исследования. Завершается процесс секвенированием спаренных концов, обеспечивающим высокую эффективность и производительность метода Hi-C.

Большие объемы сложно организованных данных, генерируемых в экспериментах Hi-C, привели к необходимости разработки алгоритмов и программного обеспечения для их обработки и анализа [112–114], также возникло немало конфликтующих гипотез относительно интерпретации данных Hi-C, что привело к дискуссиям – например, о том, что именно соответствует А/В-компартаментам и топологически ассоциированным доменам на молекулярном уровне [115, 116].

Как и подходы к обработке его результатов, сам метод Hi-C также постоянно модифицируется. Революционность Hi-C заключалась в том, что с его помощью можно было оценивать взаимодействия всех локусов генома между собой, однако минимальный размер этих локусов, который называется разрешением метода Hi-C, был довольно ограничен (в оригинальном методе их наименьший размер составлял одну мегабазу). Это ограничение происходит из-за особенностей используемых рестриктаз (избирательность которых в отношении сайтов рестрикции ограничивает минимальные размеры создаваемых фрагментов) и недостаточной глубины секвенирования [114]. Авторы модификаций протокола Hi-C зачастую стремятся достичь более высокого разрешения путем изменения набора используемых ферментов: либо с помощью выбора эндонуклеаз рестрикции

с сайтом узнавания меньшей длины [117, 118], либо с помощью эндонуклеаз других классов, отличающихся малой специфичностью – например, ДНКазы I [119] или микрококковой нуклеазы [120]. Использование последней позволило достигнуть разрешения сопоставимого с линейными размерами отдельных нуклеосом, что дало возможность изучать компактизацию хроматина на низшем, супрануклеосомном уровне [121, 122]. Фактор глубины секвенирования также успешно регулируется: если в работе 2009 г., в которой метод Hi-C был использован впервые, покрытие составляло до 30 млн прочтений на образец, то уже к 2017 г. этот показатель удалось увеличить до 7.3 млрд чтений на образец [123].

Стоит отметить, что Hi-C является методом, представляющим статистические, усредненные по ансамблю клеток данные о трехмерной архитектуре генома, что ограничивает его потенциал для изучения структуры хроматина и поднимает вопросы о том, что представляют собой выявляемые на контактных картах паттерны (такие как А/В-компарменты и топологически ассоциированные домены): репрезентацию структур и процессов, которые можно обнаружить в отдельных клеточных ядрах, или феномены, возникающие при усреднении данных. Однако так же, как и проблема с ограничением разрешения, этот недостаток устраняется путем создания новых протоколов – в данном случае single-cell Hi-C [124], позволяющих изучать пространственную геномику отдельных клеток и, сопоставляя результаты этого анализа с данными, полученными при проведении Hi-C на множестве клеток, устанавливать, какие из обнаруженных закономерностей организации генома реализуются в конкретных клетках, а какие являются, скорее, усредненными представлениями [125].

#### ВЛИЯНИЕ COVID-19 НА ПРОФИЛИ ДОСТУПНОСТИ ХРОМАТИНА В ИММУННЫХ КЛЕТКАХ

Большинство исследований иммунного ответа на SARS-CoV-2 сосредоточены на аспектах воспаления [126, 127], однако есть ряд работ, где обсуждаются эпигеномные регуляторные механизмы иммунного ответа клеток хозяина. В данном разделе будут рассмотрены результаты исследований анализа доступности хроматина в популяциях иммунных клеток, полученные методами ATAC-seq и его модификацией для анализа единичных клеток scATAC-seq от пациен-

тов COVID-19 с симптомами различной тяжести (легкими, средними (умеренными), тяжелыми). Так, в работе N.S. Giroux и соавт. были исследованы пациенты с легкой или средней тяжестью симптомов COVID-19 [83], в работе S. Li и соавт. исследовали пациентов со средней и тяжелой симптоматикой COVID-19 [128], в работе M. You и соавт. был сделан акцент на выздоравливающих пациентах [129], а объектом работы Y. Zheng и соавт. были пациенты разных возрастных групп [130]. В качестве биологических образцов во всех работах были использованы МНПК, преимущества которых для данного типа эксперимента уже обсуждались выше.

Индикатором перехода от врожденного иммунитета к приобретенному является сероконверсия, т. е. появление специфических антител в сыворотке крови, медианное время которой в случае COVID-19 составляет 10 дней [131]. В работе N.S. Giroux и соавт. исследовали доступность хроматина на ранних стадиях заболевания до сероконверсии IgG [83]. Было показано, что наибольшие изменения доступности хроматина происходят по большей части в CD14<sup>+</sup> моноцитах в генах сигнальных путей интерлейкиновой сигнализации, регуляции клеточной дифференцировки и клеточной морфологии. В этой работе также были выявлены 455 дифференциально доступных областей хроматина, которые статистически значимо различались между пациентами с легкими и умеренными симптомами в субпопуляции CD14<sup>+</sup> моноцитов до сероконверсии. Более того, авторы посредством анализа корреляций между доступностью мишеней транскрипционных факторов (методом scATAC-seq) и экспрессии соответствующих генов (методом scRNA-seq) выявили сигнальные пути, характерные для двух когорт пациентов с легкими и умеренными симптомами соответственно. Как сообщается в работе [83], для образцов пациентов с легким течением характерна активация классических противовирусных сигнальных путей, включающих транскрипционные факторы IRF7, IRF1 и STAT1. В то время как для образцов пациентов с умеренными симптомами характерна активация транскрипционных факторов SEBPB и KLF3 (регулируют поляризацию моноцитов-макрофагов). Как было показано в этом исследовании, эпигенетические изменения доступности хроматина появляются раньше и сохраняются дольше по сравнению с соответствующими транскрипционными изменениями, что делает их возможными биомаркерами для прогнозирования течения заболевания и формирования иммунного ответа.

В работе M. You и соавт. [129] исследовали профили доступности хроматина пациентов с умеренной или тяжелой формой COVID-19 на 4–12-й нед. после выздоровления (10 пациентов). Авторы идентифицировали основные типы иммунных клеток и показали, что у выздоровевших от COVID-19 пациентов увеличилась доля моноцитарных клеток (в частности CD14<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов), субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток (эффektorных и клеток памяти) и уменьшилась доля популяции В-клеток. Для различных стадий дифференцировки отмеченных выше популяций иммунных клеток был проведен детальный анализ цис- и транс регуляторных элементов, под которыми чаще всего подразумевают промоторы и энхансеры, располагающиеся по отношению к регулируемым генам на тех же или других хромосомах соответственно. В частности, было выявлено, что по мере созревания моноцитов (от обученных к зрелым через состояние активированных) увеличивается доступность хроматина в локусах IL1 $\beta$  и CCL5. Также авторы обнаружили повышенную доступность мотивов факторов транскрипции IRF1, IRF3 и IRF8 в обученных моноцитах CD14<sup>+</sup> и доступность мотивов для AP-1 и факторов FOS и JUN в моноцитах на стадиях активации и созревания. По результатам анализа различных клеточных состояний в ходе дифференцировки В-клеток было показано, что при COVID-19 они проходят ускоренную программу развития от незрелых В-клеток до антитело-продуцирующих плазматических клеток. Авторы сравнили доступность хроматина для узнавания транскрипционными факторами в субпопуляциях В-клеток и отметили, что образцы выздоравливающих от COVID-19 имеют ряд особенностей, отличающих их от образцов здоровых доноров, например в них: 1) менее доступен хроматин для узнавания субъединицами транскрипционных факторов семейства NF-kB, включая REL, RELA и RELB, которые участвуют в поддержании и гомеостазе В-клеток зародышевого центра; 2) хроматин наивных, клеток памяти и плазматических В-клеток более доступен в мотивах узнавания факторами транскрипции семейства AP-1, включая FOS и JUN, которые вовлечены в сигнальный путь рецепторов В-клеток и указывают на их дифференцировку и активацию; 3) в наивных В-клетках увеличена доступность хроматина с мотивами узнавания факторами транскрипции SPI1, EBF1, IRF4 и POU2F2, которые важны для выживания В-клеток, дифференцировки и рецепторной сигнальной реакции. Согласно результатам комплексного анализа активности транскрипционных факторов,

который основывался на доступности хроматина в промоторах генов этих факторов и генов их мишеней во время дифференцировки В-клеток, было показано, что активирующие факторы способствовали поддержанию и гомеостазу В-клеток у здоровых доноров и способствовали активации, дифференциации и рекомбинации переключателей подклассов IgG у пациентов, выздоровевших от COVID-19.

В работе M. You и соавт. [129] также был проведен комплексный анализ CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в результате которого были выявлены изменения паттернов доступности цис-регуляторных элементов эффекторных генов по мере дифференцировки Т-клеток. Например, доступность хроматина в локусах GZMB и IFNG в промоторах и дистальных энхансерах постепенно увеличивалась по мере созревания Т-клеток. Для получения комплексной информации о ландшафте хроматина в иммунных клетках авторы [129] разработали метод TCR–FACS–index–ATAC секвенирование (Ti-ATAC-seq), сочетающий секвенирование Т-клеточных рецепторов (scTCR-seq), сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и ATAC-seq. Методом scTCR-seq авторы оценили скорость клональной экспансии в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках и заключили, что именно эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки играют ключевую роль в борьбе с патогеном и в долгосрочной иммунной защите. Применение метода Ti-ATAC-seq позволило показать, что хроматин в клонах CD8<sup>+</sup> Т-клеток, претерпевших клональную экспансию, доступен для транскрипционных факторов TBET и EOMES, по сравнению с неразмноженными клонами. Данные наблюдения согласуются с показанным методом scATAC-seq результатом о важности этих факторов в развитии CD8<sup>+</sup> Т-клеток (эффекторных и клеток памяти) у выздоравливающих после COVID-19 пациентов. Суммируя, M. You и соавт. посредством детального анализа эпигеномного ландшафта хроматина лиц, переболевших COVID-19, выявили ключевую роль эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток на начальном этапе контроля инфицирования (до клональной экспансии) и в формировании CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти посредством глобального ремоделирования доступности хроматина.

Другим примечательным исследованием эпигенетического ландшафта хроматина и транскрипционных профилей в иммунных клетках является работа S. Li и соавт. [128]. Авторы провели анализ доступности хроматина в МНПК в

когортах пациентов со средним и тяжелым течением заболевания и здоровых доноров (по три человека в каждой группе), выявили изменения доли доступных цис-регуляторных элементов в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и построили сети цис-регуляторных взаимодействий. В результате было показано, что некоторые локусы (например, *CCL3*) имели схожие сети регуляции в трех когортах сравнения, а другие (например, *RUNX3* в CD4<sup>+</sup> Т-клетках) имели различающиеся паттерны взаимодействий с цис-регуляторными элементами. В образцах пациентов с тяжелой симптоматикой мотивы транскрипционных факторов TBX21, NFKB1, TP53, STAT1, MAFK и RUNX3 были менее доступны в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках по сравнению с образцами пациентов с умеренными симптомами. Дифференциально различающиеся между когортами пациентов локусы доступного хроматина были проанализированы на обогащение сигнальных путей по базам Gene Ontology и KEGG. Li S. и соавт. показали, что в образцах пациентов с COVID-19 обогащены сигнальные пути MAPK и TNF. Ключевым выводом работы служит предположение о том, что активированное и “воспалительное” состояние Т-клеток (особенно CD8<sup>+</sup> Т-клеток), связанное со снижением функций CD4<sup>+</sup> Т-клеток у пациентов с тяжелыми симптомами, может быть основным фактором, определяющим патогенез и выздоровление от COVID-19.

В работе Y. Zheng и соавт. основным фокусом исследования был анализ различий в ландшафте хроматина иммунных клеток у пациентов разных возрастов для выявления причин, по которым пожилые люди более восприимчивы к инфекциям и хуже реагируют на вакцины [130]. Авторы сравнивали образцы МНПК молодых (до 45 лет) и пожилых (старше 60-ти) пациентов с COVID-19 и здоровых доноров методами scRNA-seq, scATAC-seq, масс-цитометрией CyTOF и scTCR/BCR-seq (не все когорты были проанализированы всем набором методов). Однако доступность хроматина была измерена только в образцах здоровых молодых и пожилых доноров. Основные результаты исследования следующие: 1) старение перепрограммирует ландшафт иммунных клеток человека в сторону поляризованного и воспалительного состояния; 2) в процессе старения увеличивается экспрессия генов восприимчивости к SARS-CoV-2 (*CD147*, *CD26* и *ANPEP*, которые могут являться альтернативными клеточными рецепторами для SARS-CoV-2 в иммунных клетках крови, где не экспрессируется ACE2); 3) увеличение поляри-

зации иммунных клеток и воспаление в кровеносном русле при старении может быть усилено вирусной инфекцией COVID-19; 4) возрастные дендритные клетки имеют повышенную экспрессию интерферон-стимулированных генов и сниженную способность презентировать антиген; 5) результаты анализа одноклеточных TCR и BCR показывают, что старение связано с уменьшением разнообразия и увеличением клональности эффекторных, цитотоксических и истощенных подмножеств CD8<sup>+</sup> Т-клеток и подмножества В-клеток, ассоциированных с возрастом; 6) профили доступности хроматина в единичных иммунных клетках показывают, что наибольшие изменения в процессе старения происходят в областях, кодирующих транскрипционные факторы семейства AP-1, которые дополнительно активируются при COVID-19. Авторы работы [130] также установили, что старение увеличивает экспрессию генов, связанных не только со старением, но и с воспалением и восприимчивостью к SARS-CoV-2 в определенных подтипах клеток. COVID-19, в свою очередь, вызывает изменения ландшафта иммунных клеток, сходные с изменениями при старении, и еще больше усиливает вызванную старением поляризацию иммунных клеток и повышение регуляции генов воспаления.

Таким образом, в результате анализа доступности хроматина в единичных клетках вместе с данными других экспериментальных методов (scRNA-seq, масс-цитометрией CyTOF, FACS, scTCR/BCR-seq) стало возможным детальное описание перепрограммирования ландшафта хроматина в популяциях иммунных клеток крови на разных этапах заболевания COVID-19 у пациентов с симптоматикой разной тяжести.

#### ИЗМЕНЕНИЕ ГИСТОНОВЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ SARS-CoV-2

Эпигенетические механизмы, в частности пост-трансляционные модификации (ПТМ) гистонов, позволяют клеткам реагировать на изменения окружающей среды и посредством изменения профилей экспрессии быстро к ним адаптироваться. В ответ на инфицирование патогенами происходит активация иммунной системы, а изменения в программах экспрессии генов осуществляются в том числе посредством изменения ПТМ гистонов, которые можно проанализировать методом ChiP-seq. Первые работы об иммунном ответе на COVID-19 опи-

сывали изменения экспрессии провоспалительных цитокинов и интерлейкинов (IL2, IL7, IL10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A, TNF $\alpha$  и др.) в плазме крови пациентов с тяжелым течением COVID-19 [132], а более ранние иммунологические исследования сообщали об изменении соотношения меток эу- и гетерохроматина в промоторах провоспалительных генов в иммунных клетках [133, 134].

Одной из первых работ, в которой исследовали уровень метилирования гистонов в МНПК пациентов COVID-19, является работа X. Yang и соавт. [135]. В ней различия в общем уровне метилирования гистонов между донорами и пациентами с COVID-19 на примере наиболее изученных меток, контролирующей экспрессию генов, – H3K4me3 (метка активного промотора) и H3K27me3 (метка факультативного гетерохроматина) не были выявлены. Однако в этой работе были выявлены различия метилирования промоторов микроРНК, в частности miR-146a, miR181a-2 и miR-48. Ранее сообщалось, что экспрессия микроРНК (измеренная методом RNA-seq) различается у пациентов с COVID-19 и доноров [136, 137]. Так, результаты двух экспериментальных методов – RNA-seq [136, 137] и ChiP-seq [135] согласуются и демонстрируют снижение уровня экспрессии микроРНК miR-146a и miR181a-2 и увеличение уровня экспрессии miR-48 у пациентов с COVID-19. miR-146a связывается с мРНК гена *IL-6*, что приводит к репрессии трансляции и уменьшению количества белка IL6. Подавление уровня микроРНК miR-146a, отмеченное у пациентов с COVID-19, по всей видимости, приводит к ингибированию пролиферации моноцитов и способствует ускользанию от иммунологического надзора. Более подробно роль микроРНК в процессе инфицирования SARS-CoV-2 и регуляции лекарственных мишеней для терапии COVID-19 обсуждается в работе [137].

Отдельным любопытным вопросом является переносимость респираторного заболевания COVID-19 пациентами-курильщиками. Как было продемонстрировано в мета-анализе [138] на основе 73 исследований, курение значительно ассоциировано с повышенным риском смерти от COVID-19 (объединенный относительный риск смертности от COVID-19 у курильщиков составляет 1.19%). Стоит отметить, что курение провоцирует экспрессию гена *RIOX2* (также известного как *MDIG*) в легких, который в норме там не экспрессируется [139]. Повышенная экс-

прессия гена *RIOX2*, в свою очередь, ассоциирована с меньшей общей выживаемостью при раке легкого [140]. Продукт гена *RIOX2* является гистоновой деметилазой и стирает метильные метки в позиции H3K9me3 – метки конститутивно гетерохроматина. Но, что интересно, в работе Q. Zhang и соавт. [141] было показано, что экспрессия гена *RIOX2*, вызванная курением, способствует, за счет стирания репрессивных меток активации ряда белков, способствующих инфицированию SARS-CoV-2. В частности, к ним относятся белки NRP1 и NRP2, которые способствуют проникновению SARS-CoV-2 в эпителиальные клетки дыхательных путей за счет связывания с С-концевым мотивом субъединицы 1 спайк-белка, катепсины, протеолитически активирующие спайк-белок и другие белки, белки гликозилирования (гликозилирование белков SARS-CoV-2 необходимо для сборки вириона и способствует защите вируса от иммунного ответа хозяина [142]) и др. Авторы работы [141] показали схожий эффект воздействия мышьяка на экспрессию *RIOX2* и предположили, что *RIOX2* определяет тяжесть COVID-19 в ответ на воздействие факторов окружающей среды, а одной из эффективных стратегий для облегчения симптомов и снижения смертности от COVID-19 может быть терапия, направленная на подавление *RIOX2*.

#### ИЗМЕНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ УКЛАДКИ ГЕНОМА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ SARS-CoV-2

Трехмерная структура генома в клетках эукариот является определяющим фактором для его функционирования, влияет на транскрипцию, рекомбинацию и репарацию ДНК [143]. Недавно влияние SARS-CoV-2 на структуру генома инфицируемых клеток было исследовано с помощью метода захвата конформации хромосом Hi-C 3.0 [144]. В результате данных экспериментов была обнаружена массивированная реструктуризация хроматина хозяина [144].

Во-первых, по результатам анализа главных компонент было зафиксировано изменение распределения по геному А- и В-компарментов, в значительной степени перекрывающихся с транскрипционно активным/неактивным хроматином соответственно. Это изменение сводится к тому, что инфекция SARS-CoV-2 повсеместно ослабляет выраженность А-компармента клеток хозяина, вплоть до полного перевода части его в В-компармент, а так-

же усиливает В-компармент. Примерно 30% всего хроматина в геноме заражаемых клеток (культура клеток человеческой легочной аденокарциномы A549) претерпевала изменения по данному направлению. При этом также было показано увеличение доли гетеротипических межкомпарментных взаимодействий А–В (в том числе между разными хромосомами) за счет уменьшения гомотипических взаимодействий А–А. Расширенные исследования, использовавшие подходы вестерн-блот и ChIP-seq, показали, что эти изменения связаны с двумя процессами, происходящими с хроматином, который вне заражения находится в А-компарменте, а при заражении переходит в В-компармент: заметным снижением уровня метки активного хроматина H3K27ac и умеренным увеличением уровня метки гетерохроматина H3K9me3. Таким образом, SARS-CoV-2 нарушает компарментализацию хроматина хозяина, по крайней мере частично, через перепрограммирование модификаций хроматина.

Во-вторых, было показано, что заражение ведет к снижению количества ближних контактов в пределах топологически ассоциированных доменов (ТАД) при отсутствии статистически достоверного снижения уровня контактов за их пределами.

Наконец, в-третьих, замечено, что заражение ведет к увеличению уровня взаимодействий между хромосомами, а также дальних (>28 Мб) взаимодействий внутри хромосом, что также свидетельствует об изменении структуры хроматина в ходе инфекции. Показано, что эти изменения связаны с изменением внутри ТАДов когезиновых комплексов, их образующих.

Вероятно, все данные изменения направлены на противодействие защите хозяина и облегчение распространения по организму. Дело в том, что, как показали исследования ChIP-seq и RNA-seq, эти изменения происходили в областях регуляции генов воспалительного ответа и напрямую связаны с изменениями их транскрипционной активности. В первую очередь, эти изменения связаны с подавлением экспрессии генов интерферонов, участвующих в борьбе клетки с вирусной инфекцией, а также с активацией экспрессии провоспалительных генов, таких как *IFIT1/2/3/5*, *DDX58* и *IL6*. Авторы работы [144] также отмечают, что другие коронавирусы, например, Human Coronavirus OC43, а также другие индукторы иммунного

ответа, по последним данным, не вызывают подобных изменений. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения являются уникальными, вызванными инфекцией SARS-CoV-2, и не связаны с врожденной иммунной сигнализацией или вирусной инфекцией как таковой. Знания о данной реструктуризации при заражении важны для понимания эпигенетических изменений в организме хозяина и для облегчения дальнейших исследований последствий вирусных инфекций. Дело в том, что эти знания, а также знания о том, какие белки используются вирусом, позволяют построить механистические модели вирусного патогенеза. В частности, предполагается, что SARS-CoV-2 оказывает следующие воздействия на геном: мимикрирует под гистон H3 и направляет на себя некоторые модификации, которые в норме приводили бы к активации тех или иных генов, что ослабляет А-компарменты (см. следующий раздел), истощает каким-то образом когезиновый комплекс по всему геному, но избирательно только из областей внутри ТАДов. При этом эти изменения переключаются с дерегуляцией экспрессии генов иммунного ответа. Предполагается, что эта дерегуляция связана с тем, что контакты внутри ТАДов ввиду истощения когезинового комплекса ослабляются и происходит ослабление контактов энхансер–промотор, которые важны для активации генов интерферонов. Активация же генов воспалительного ответа опосредуется, видимо, избирательным внесением модификации H3K4me3 в области промоторов этих генов [145]. Тем не менее механизмы данной избирательности еще только предстоит выяснить. В одной из последующих работ было выяснено, что изменения в архитектуре хроматина играют роль в наступлении и восстановлении anosмии – одного из симптомов ранней стадии инфекции COVID-19 [146]. Дело в том, что при инфицировании вирус в числе прочего поражает обонятельные нейроны-рецепторы, где, как показано при помощи анализа Hi-C в сочетании с оригинальной вычислительной техникой реконструкции хроматинового ансамбля в обонятельных рецепторах, в результате описанных выше изменений структура хроматина модифицируется так, что это вызывает дисфункцию обонятельных рецепторов. Тем не менее для полного понимания изменения укладки хроматина в различных клетках требуются дополнительные исследования, в частности основанные на 3D-реконструкциях с улучшенным разрешением.

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ SARS-CoV-2

Молекулярные механизмы, которые стоят за изменениями, описанными в предыдущем разделе, пока что не являются окончательно определенными. Тем не менее в настоящее время намечился определенный прогресс в данной области. В частности, показано, что геном SARS-CoV-2 содержит в своем составе ген белка ORF8, который мимикрирует под критически важную в регуляции транскрипции N-концевую область человеческого гистона H3 [147]. При этом биоинформатический анализ показал, что наличие мимиков гистонов заражаемых клеток – это особенность, отличающая SARS-CoV-2 от других коронавирусов. Во время инфекции ORF8 высоко экспрессируется в клетке-хозяине, причем на более высоких уровнях, чем сам гистон H3. При этом, как показал протеомный анализ, ORF8 связывает ДНК-метилтрансферазу 1 (DNMT1). То, что ORF8 работает, конкурируя с гистонами, доказывается следующими фактами: 1) он имеет ядерную локализацию при трансфекции клеток НЕК 293Т конструкцией, кодирующей Strep-меченый ORF8, при этом он колокализуется с белками ядерной ламины; 2) он связан с хроматином, так как он диссоциирует от фракции хроматина при ионной силе, аналогичной той, при которой диссоциируют белки ламины и гистоны; 3) биоинформатически выявляемый сайт мимикрии влияет на сродство к хроматину, так как при его делеции константа диссоциации его от хроматина резко повышается; 4) он связывается с геномной ДНК в определенных геномных регионах, особенно в тех, которые связаны с H3K27me3, что доказывается методом иммунопреципитации хроматина ChIP-seq. Кроме того, показано, что ORF8 ассоциируется с ламинем B1, гистонами H3 и HP1 $\alpha$ , белком, ассоциированным как с белками ламины, так и с гистонами. Наконец, показано, что ORF8 связывается с гистон-модифицирующими ферментами, которые нацелены на тот мотив в гистоне H3, под который ORF8 мимикрирует. Речь идет, например, про ацетилтрансферазу KAT2A, нацеленную на H3K9. Метод масс-спектрометрии с параллельным мониторингом реакции (LC-PRM-MS) при этом показал, что данный фермент может беспрепятственно модифицировать ORF8 по аналогии с тем, как он модифицирует H3. Наконец, показано, что экспрессия ORF8 ведет к заметному снижению уровня KAT2A в клетке. Эти данные свидетельствуют о том, что ORF8 не только связывается с такими белками, как ацетилтранс-

феразы, но и, вероятно, модифицируется ими подобно гистону H3 и вызывает их деградацию. В совокупности эти результаты показывают, что ORF8 может выступать в качестве мимика гистона на основе своей ассоциации с хроматином и хроматин-модифицирующими ферментами и способности истощать гистоновую ацетилтрансферазу KAT2A. Дальнейшие исследования показали, что экспрессия ORF8 нарушает собственные гистоновые модификации в хроматине. В частности, при помощи масс-спектрометрии, иммунохимии и ряда других подходов показано, что в клетках, трансфицированных геном *ORF8*, наблюдается общее повышение уровня модификаций, связанных с транскрипционной репрессией, и понижение уровня модификаций, связанных с транскрипционной активацией. Так, были повышены уровни метилированных H3K9 и H3K27, а также снижены уровни ацетилированных H3K9 и H3K14. При этом ORF8 с делетированным участком мимикрии не демонстрирует данных особенностей влияния на модификации гистонов. Эти данные показывают, что ORF8 способен нарушать регуляцию модификаций гистонов в многочисленных критических местах, при этом в данном процессе участвует участок мимикрии. Применение метода RNA-seq показало, что эти изменения влияют на паттерны дифференциальной экспрессии в сторону снижения экспрессии исходно высоко экспрессируемых генов. Аналогичные с результатами, полученными при трансфекции гена *ORF8*, данные демонстрируются и при вирусной инфекции вирусом с делецией и без делеции в гене *ORF8* в клетках культуры A549, обогащенных ACE2. Это свидетельствует о том, что именно *ORF8* отвечает за описываемые изменения в ходе вирусной инфекции. Показано также, что ORF8 имеет и другие функции, не связанные с мимикрией гистонов, тем не менее эти функции уже не являются предметом данного обзора. Так или иначе, функциональный ORF8 посредством мимикрии под гистон H3 дестабилизирует внутренние регуляторные пути, связанные с эпигенетическим контролем, и тем самым меняет паттерн модификации гистонов в клетках, что напрямую связано с тяжестью заболевания, в частности – с блокировкой путей защиты клеток от инфекции [147].

Помимо ORF8, как выяснилось, в патогенезе участвует главная протеиназа Mpro, которая расщепляет деацетилазу гистонов и тем самым ведет к снижению экспрессии генов интерферонового ответа через изменение доступности хромати-

на [148]. Тем не менее есть ряд генов, которые очень важны для инфекции, а потому снижение их транскрипционной активности в ходе инфекции недопустимо. Чтобы выявить данные гены, Х.Н. Танг и соавт. перед заражением проводили нокаут ряда генов посредством системы Cas9 с гРНК, нацеленной на каждый из генов, который не репрессировался в ходе инфекции. Работу проводили на органоидных моделях тканей респираторного отдела, воздухопроводящих путей и сердца взрослого человека, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток человека, заражаемых вирусом [53]. Показано, что важную роль в вирусной инфекции играют гены *ACE2*, *IFN1*, *CIART*, *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *H2AC6* и т.д. Наибольшую устойчивость к вирусу клетки приобретали при нокауте гена *CIART*. Это – регулятор, который в норме выступает как регулятор циркадно-часовой петли обратной связи. Как оказалось, этот ген играет роль и в других вирусных инфекциях. Дело в том, что “выключение” этого гена снижает синтез жирных кислот, а это очень критично для вируса.

Описываемые перестройки, вызванные ORF8 и Mpro, – это не единственные варианты регуляции транскрипционной активности, опосредованные SARS-CoV-2. Так, показано, что вирус способен к модуляции экспрессии генов хозяина через изменение активности транспозонов [149]. Если конкретнее, он изменяет уровень транскриптов ретротранспозонов (например, HERV и LINE-1) в клетке, причем в случае разных транспозонов – в разные стороны. Это показал анализ данных из клеточных линий и первичных образцов пациентов. Это ведет к тому, что транспозоны активнее встраиваются в гены, вовлеченные в иммунный ответ, и это снижает уровень активности соответствующих белков. Другие вирусы, например MERS-CoV, вирус гриппа А, вирус парагриппа человека типа 3 и пр., также влияют на экспрессию транспозонов, причем иначе, чем SARS-CoV-2. Дифференциальная экспрессия транспозонов является видоспецифичной для вирусов. Механизм регуляции до конца непонятен, но известно, что, согласно данным ChIP-seq, имеет место накопление H3K27Ac перед дифференциально экспрессируемыми в ходе инфекции SARS-CoV-2 транспозонами, а также связывание их с активирующими транс-факторами, включая компоненты сигналинга NF-κB. Индукция ретроэлементов имеет тканевую специфичность, однако однозначно коррелирует с заболеванием. В целом дифференциальная экспрессия транспозонов после вирусных ин-

фекций может дать представление о патогенезе заболевания и уникальных вирусных метках в вирусной диагностике [149]. Помимо транспозонов и генов иммунного ответа были обнаружены и иные регуляторные гены, которые обязательно ингибируются или активируются в ответ на инфекцию через изменение доступности хроматина. В частности, показано, что за счет данных регуляторных событий в клетках повышается уровень экспрессии генов *ACE2* и *TMPRSS2*, которые участвуют напрямую в инфекции [150], через изменение экспрессии их регуляторов, действующих через цис-регуляторные элементы. Знания об этом позволяют разрабатывать новые терапевтические стратегии против инфекции SARS-CoV-2.

Еще один из механизмов, связанных с тяжестью инфекции и завязанных на ремоделировании хроматина, — это механизм, связанный с активностью комплексов mSWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), которые осуществляют ремоделирование хроматина млекопитающих, а именно — канонических комплексов BRG1/BRM-ассоциированного фактора (сBAF) [151]. Все комплексы mSWI/SNF содержат АТ-Фазную субъединицу, SMARCA4 или SMARCA2 (они также известны как BRG1 и BRM соответственно), и целый ряд общих и специфических для конкретного комплекса субъединиц, обеспечивающих специфичность регуляции транскрипции. Так, активность SMARCA4 в ряде комплексов в ряде клеток повышает в числе прочего доступность хроматина в локусе *ACE2* и тем самым опосредует восприимчивость к вирусу. Происходит это путем АТФ-зависимой репозиции нуклеосом в определенных частях генома, определяемых дифференцировкой клеток, что делает инициацию транскрипции в этих местах более вероятным процессом. Сами же комплексы mSWI/SNF рекрутируются в энхансеры *ACE2* транс-факторами HNF1A/B. Ингибиторы АТ-Фазы mSWI/SNF подавляют экспрессию ангиотензин-превращающего фермента 2 (*ACE2*) и придают устойчивость к SARS-CoV-2. Иными словами, данный механизм повышения вирулентности SARS-CoV-2, завязанный на хроматине, скорее основан на вероятном заражении клеток с определенными модификациями хроматина. Эти данные определяют потенциальный класс противовирусных препаратов, которые повышают устойчивость к вирусу через временное блокирование экспрессии *ACE2* в клетках человека за счет модуляции работы ремоделлеров хроматина.

Наконец, по-видимому существует еще один механизм, который основан на общеизвестном механизме образования телец Барра — гетерохроматиновых конструкций на базе одной из двух X-хромосом у женщин — в каждой клетке. Известно, что тяжелая форма COVID-19 возникает при прочих равных условиях чаще у мужчин, чем у женщин. Одно из объяснений может заключаться в том, что на X-хромосоме находится ген *TLR7*, опосредующий интерфероновые ответы, помогающие в борьбе с вирусом. У мужчин по сравнению с женщинами чаще наблюдается фенотипически проявляющая себя дерегуляция данного гена, что является предпосылкой к развитию тяжелой формы COVID-19. Связано это с тем, что нарушения в этом гене у мужчин более критичны, так как у них существует одна копия X-хромосомы и нет механизма дозовой компенсации экспрессии X-сцепленных генов, а у женщин копий X-хромосомы две и механизм дозовой компенсации экспрессии X-сцепленных генов, выражающийся в образовании телец Барра, есть [152].

#### ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ГИСТОНЫ

В качестве еще одного молекулярного механизма патогенеза COVID-19 отметим роль гистонов вне клеточного ядра. Одной из стратегий врожденного иммунитета является формирование внеклеточных ловушек, которые формируются иммунными клетками моноцитами/макрофагами и нейтрофилами. Эти клетки выбрасывают во внеклеточное окружение ДНК, гистоны, некоторые белки и ферменты (например, эластаза нейтрофилов), которые образуют трехмерную паутинообразную сеть, задерживающую патогены [153]. Большую часть белков (порядка 70%) НВЛ составляют внеклеточные гистоны, которые оказывают цитотоксическое действие через разрушение мембраны, повышение внутриклеточного кальция, активацию Toll-подобных рецепторов, инфламмосомы и системы комплемента. В ряде исследований сообщалось о нахождении НВЛ в образцах пациентов с COVID-19 [154] (в том числе с тяжелой формой [155, 156]). В мета-обзоре [157] было отмечено, что повышенная концентрация гистонов в крови наблюдается у пациентов с неблагоприятными клиническими исходами. W. Hong и соавт. с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса показали, что гистоны H3 и H4, входящие в состав НВЛ, могут связываться избирательно с субъединицей 2 спайк-белка (S) и это усиливает инфекционность SARS-CoV-2,

что нетипично по сравнению с иными вирусными инфекциями. Судя по всему, гистон образует мостик между сиаловой кислотой на клетках хозяина и спайк-белком SARS-CoV-2, что способствует слиянию мембран и инфицированию вирусом [158]. Существуют данные, которые свидетельствуют о том, что вирус может в некоторых случаях специально провоцировать нетоз путем повышения цитруллинированного гистона H3 в нейтрофилах – инициатора образования НВЛ, тем самым утяжеляя ход инфекции. Считается, что это связано с активацией PAD4, собственного фермента нейтрофилов, который отвечает за образование цитруллинированной модификации H3. Тем не менее пока что не ясно, опосредуется ли активация PAD4 непосредственно инфекцией нейтрофилов SARS-CoV-2 или же он связан с “цитокиновым штормом”, который при инфекции также может происходить [159].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание молекулярных механизмов патогенеза COVID-19 явилось значительным вызовом для современной науки. Однако впервые у ученых были в распоряжении столь продвинутые методы исследования из областей структурной биологии, геномики, молекулярной и клеточной биологии, а также доступ к большому количеству образцов. В настоящем обзоре на примере изучения COVID-19 и вируса SARS-CoV-2 продемонстрированы возможности современного анализа структуры и динамики хроматина и роль изменений в хроматине в патогенезе этого заболевания. Изменения в структуре хроматина происходят как в иммунных клетках, которые активируются в ответ на инфекцию, так и в инфицируемых клетках. В инфицируемых клетках изменения в структуре хроматина не только опосредуют клеточный ответ на инфекцию, но и вызываются и модулируются самим вирусом с помощью ряда белков, кодируемых вирусом. Хотя на сегодняшний момент полностью не поняты все механизмы взаимодействия вирусов с эпигенетической машинерией клеток, дальнейшие исследования в данном направлении будут способствовать пониманию патогенеза заболевания и совершенствованию методик лечения.

Работа поддержана в рамках научной темы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации “Полногеномный эпигенетический анализ как основа разработки генетических технологий профилактики и терапии ковида” (FFRW-2023-0007), регистрационный

номер 123120500032-9, а также Российским Научным Фондом (грант номер 19-74-30003, в части анализа молекулярных механизмов модуляции работы хроматина), грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1062 (в части методов изучения трехмерной структуры хроматина). А.К. Грибкова благодарит за поддержку Некоммерческий Фонд развития науки и образования “Интеллект”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard [Electronic resource]. URL: <https://covid19.who.int> (accessed: 01.06.2023)
2. Cases, data, and surveillance [Electronic resource] // Centers for Disease Control and Prevention. 2020. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/burden.html> (accessed: 01.06.2023)
3. Jackson C.B., Farzan M., Chen B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. № 1. P. 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
4. Jamison D.A., Anand Narayanan S., Trovão N.S. et al. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection // *Eur. J. Hum. Genet.* 2022. V. 30. № 8. P. 889–898. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>
5. Singh K.K., Chaubey G., Chen J.Y. et al. Decoding SARS-CoV-2 hijacking of host mitochondria in COVID-19 pathogenesis // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2020. V.319. № 2. P. C258–C267. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00224.2020>
6. Tsai K., Cullen B.R. Epigenetic and epitranscriptomic regulation of viral replication: 10 // *Nat. Rev. Microbiol.* Nature Publ. Group, 2020. V. 18. № 10. P. 559–570. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0382-3>
7. Zhang Q., Cao X. Epigenetic regulation of the innate immune response to infection: 7 // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publ. Group, 2019. V. 19. № 7. P. 417–432. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0151-6>
8. Chu H., Chan J.F.-W., Yuen T.T.-T. et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications

- for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: An observational study // *Lancet Microbe*. 2020. V. 1. № 1. P. e14–e23. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)
9. *Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T.* One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice // *J. Natl. Cancer Inst.* 1977. V. 59. № 1. P. 221–226. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>
  10. *Coimbra L.D., Borin A., Fontoura M. et al.* Identification of compounds with antiviral activity against SARS-CoV-2 in the MMV pathogen box using a phenotypic high-throughput screening assay // *Front. Virol.* 2022. V. 2: 854363.
  11. *Arslan M., Xu B., Gamal El-Din M.* Transmission of SARS-CoV-2 via fecal-oral and aerosols-borne routes: environmental dynamics and implications for wastewater management in underprivileged societies // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140709>
  12. *Kipkorir V., Cheruiyot I., Ngure B. et al.* Prolonged SARS-CoV-2 RNA detection in anal/rectal swabs and stool specimens in COVID-19 patients after negative conversion in nasopharyngeal RT-PCR test // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. № 11. P. 2328–2331. <https://doi.org/10.1002/jmv.26007>
  13. *Zhang H., Kang Z., Gong H. et al.* Digestive system is a potential route of COVID-19: An analysis of single-cell coexpression pattern of key proteins in viral entry process // *Gut.* 2020. V. 69. № 6. P. 1010–1018. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320953>
  14. *Cinatl J., Hoever G., Morgenstern B. et al.* Infection of cultured intestinal epithelial cells with severe acute respiratory syndrome coronavirus // *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 16. P. 2100–2112. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4222-9>
  15. *Bojkova D., Klann K., Koch B. et al.* Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets // *Nature.* 2020. V. 583. № 7816. P. 469–472. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2332-7>
  16. *Nakabayashi H., Taketa K., Miyano K. et al.* Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium // *Cancer Res.* 1982. V. 42. № 9. P. 3858–3863
  17. *Zhou F., Xia J., Yuan H.-X. et al.* Liver injury in COVID-19: Known and unknown // *World J. Clin. Cases.* 2021. V. 9. № 19. P. 4980–4989. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i19.4980>
  18. *Wanner N., Andrieux G., Badia-i-Mompel P. et al.* Molecular consequences of SARS-CoV-2 liver tropism: 3 // *Nat. Metab. Nature Publ. Group.* 2022. V. 4. № 3. P. 310–319. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00552-6>
  19. *Rio D.C., Clark S.G., Tjian R.* A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction // *Science.* 1985. V. 227. № 4682. P. 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.2981116>
  20. *DuBridge R.B., Tang P., Hsia H.C. et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system // *Mol. Cell. Biol.* 1987. V. 7. № 1. P. 379–387. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.1.379-387.1987>
  21. *Pear W.S., Nolan G.P., Scott M.L. et al.* Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 18. P. 8392–8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8392>
  22. *Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. et al.* Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. № 1. P. 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
  23. *Martin-Sancho L., Lewinski M.K., Pache L. et al.* Functional landscape of SARS-CoV-2 cellular restriction // *Mol. Cell.* 2021. V. 81. № 12. P. 2656–2668.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.04.008>
  24. *Weston S., Coleman C.M., Haupt R. et al.* Broad anti-coronavirus activity of Food and Drug Administration-approved drugs against SARS-CoV-2 in vitro and SARS-CoV in vivo // *J. Virol.* 2020. V. 94. № 21. <https://doi.org/10.1128/JVI.01218-20>
  25. *Xie X., Muruato A.E., Zhang X. et al.* A nanoluciferase SARS-CoV-2 for rapid neutralization testing and screening of anti-infective drugs for COVID-19 // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 5214. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19055-7>
  26. *Lednicky J.A., Wyatt D.E., Lednicky J.A. et al.* The art of animal cell culture for virus isolation // *Biomedical Tissue Culture.* IntechOpen, 2012. <https://doi.org/10.5772/51215>
  27. *Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.-C. et al.* Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19 // *Cell.* 2020. V. 181. № 5. P. 1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
  28. *Gamez A.M., Tan K.S., Chan W.O.Y. et al.* Infection of human Nasal Epithelial Cells with SARS-CoV-2 and a 382-nt deletion isolate lacking ORF8 reveals similar viral kinetics and host transcriptional profiles // *PLoS Pathog. Publ. Library Science.* 2020. V. 16. № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009130>
  29. *de Jong P.M., van Sterkenburg M.A., Kempenaar J.A. et al.* Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1993. V. 29A. № 5. P. 379–387. <https://doi.org/10.1007/BF02633985>
  30. *de Jong P.M., van Sterkenburg M.A., Hesselink S.C. et al.* Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994. V. 10. № 3. P. 271–277. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.3.8117445>
  31. *Crystal R.G., Randell S.H., Engelhardt J.F. et al.* Airway epithelial cells: Current concepts and challenges //

- Proc. Am. Thorac. Soc. 2008. V. 5. № 7. P. 772–777. <https://doi.org/10.1513/pats.200805-041HR>
32. *Jonsdottir H.R., Dijkman R.* Coronaviruses and the human airway: A universal system for virus-host interaction studies // *Virol. J.* 2016. V. 13. № 1. P. 24. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0479-5>
  33. *Fulcher M.L., Gabriel S., Burns K.A. et al.* Well-differentiated human airway epithelial cell cultures // *Methods Mol. Med.* 2005. V. 107. P. 183–206. <https://doi.org/10.1385/1-59259-861-7:183>
  34. *S Banach B., Orenstein J.M., Fox L.M. et al.* Human airway epithelial cell culture to identify new respiratory viruses: coronavirus NL63 as a model // *J. Virol. Methods.* 2009. V. 156. № 1–2. P. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.10.022>
  35. *de Araújo-Souza P.S., Hanschke S.C.H., Viola J.P.B.* Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells // *J. Immunol. Res.* 2015. V. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/849573>
  36. *Qian Z., Travanty E.A., Oko L. et al.* Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2013. V. 48. № 6. P. 742–748. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0339OC>
  37. *Zhu N., Zhang D., Wang W. et al.* A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 8. P. 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
  38. *Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T. et al.* SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells // *EMBO J.* 2020. V. 39. № 10. <https://doi.org/10.15252/embj.20105114>
  39. *Do T.N.D., Donckers K., Vangeel L. et al.* A robust SARS-CoV-2 replication model in primary human epithelial cells at the air liquid interface to assess antiviral agents // *Antiviral Res.* 2021. V. 192. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105122>
  40. *Ryu G., Shin H.-W.* SARS-CoV-2 infection of airway epithelial cells // *Immune Netw.* 2021. V. 21. № 1. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e3>
  41. *Kohli A., Sauerhering L., Fehling S.K. et al.* Proteomic landscape of SARS-CoV-2- and MERS-CoV-infected primary human renal epithelial cells // *Life Sci. Alliance.* 2022. V. 5. № 5. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201371>
  42. *Eriksen A.Z., Møller R., Makovoz B. et al.* SARS-CoV-2 infects human adult donor eyes and hESC-derived ocular epithelium // *Cell Stem Cell.* 2021. V. 28. № 7. P. 1205–1220.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.028>
  43. *Szlachcic W.J., Dabrowska A., Milewska A. et al.* SARS-CoV-2 infects an in vitro model of the human developing pancreas through endocytosis // *iScience.* 2022. V. 25. № 7. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104594>
  44. *Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M. et al.* Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 383. № 2. P. 120–128. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432>
  45. *Fosse J.H., Haraldsen G., Falk K. et al.* Endothelial cells in emerging viral infections // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.619690>
  46. *Schimmel L., Chew K.Y., Stocks C.J. et al.* Endothelial cells are not productively infected by SARS-CoV-2 // *Clin. Transl. Immunol.* 2021. V. 10. № 10. <https://doi.org/10.1002/cti2.1350>
  47. *Ma-Lauer Y., Carbajo-Lozoya J., Hein M.Y. et al.* p53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PLpro via E3 ubiquitin ligase RCHY1 // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 2016. V. 113. № 35. P. E5192–E5201. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603435113>
  48. *McCauley H.A., Wells J.M.* Pluripotent stem cell-derived organoids: Using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish // *Dev. Camb. Engl.* 2017. V. 144. № 6. P. 958–962. <https://doi.org/10.1242/dev.140731>
  49. *Duan X., Tang X., Nair M.S. et al.* An airway organoid-based screen identifies a role for the HIF1 $\alpha$ -glycolysis axis in SARS-CoV-2 infection // *Cell Rep.* 2021. V. 37. № 6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109920>
  50. *Han Y., Duan X., Yang L. et al.* Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids // *Nature.* 2021. V. 589. № 7841. P. 270–275. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2901-9>
  51. *Jacob F., Pather S.R., Huang W.-K. et al.* Human pluripotent stem cell-derived neural cells and brain organoids reveal SARS-CoV-2 neurotropism predominates in choroid plexus epithelium // *Cell Stem Cell.* 2020. V. 27. № 6. P. 937–950. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.016>
  52. *Pei R., Feng J., Zhang Y. et al.* Host metabolism dysregulation and cell tropism identification in human airway and alveolar organoids upon SARS-CoV-2 infection // *Protein Cell.* 2021. V. 12. № 9. P. 717–733. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00811-w>
  53. *Tang X., Xue D., Zhang T. et al.* A multi-organoid platform identifies CIART as a key factor for SARS-CoV-2 infection // *Nat. Cell Biol.* 2023. V. 25. № 3. P. 381–389. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01095-y>
  54. *Pontelli M.C., Castro Í.A., Martins R.B. et al.* SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients // *J. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 14. № 4. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac021>
  55. *Shen X.-R., Geng R., Li Q. et al.* ACE2-independent infection of T lymphocytes by

- SARS-CoV-2: 1 // *Signal Transduct. Target. Ther.* Nature Publ. Group, 2022. V. 7. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00919-x>
56. *Trojanowicz B., Ulrich C., Kohler F. et al.* Monocytic angiotensin-converting enzyme 2 relates to atherosclerosis in patients with chronic kidney disease // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2017. V. 32. № 2. P. 287–298. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw206>
57. *Song X., Hu W., Yu H. et al.* Little to no expression of angiotensin-converting enzyme-2 on most human peripheral blood immune cells but highly expressed on tissue macrophages // *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2023. V. 103. № 2. P. 136–145. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24285>
58. *Guha P., Das A., Dutta S. et al.* A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples // *J. Clin. Lab. Anal.* 2018. V. 32. № 1. <https://doi.org/10.1002/jcla.22181>
59. Definition of immune cell – NCI Dictionary of cancer terms – NCI [Electronic resource]: nciAppModulePage. 2011. URL: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immune-cell> (accessed: 01.06.2023)
60. *Schreier S., Triampo W.* The Blood circulating rare cell population. What is it and what is it good for? // *Cells. Multidisciplinary Digital Publ. Institute*, 2020. V. 9, № 4. <https://doi.org/10.3390/cells9040790>
61. *Wright D.E., Wagers A.J., Gulati A.P. et al.* Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells // *Science.* 2001. V. 294. № 5548. P. 1933–1936. <https://doi.org/10.1126/science.1064081>
62. *Schreier S., Borwornpinyo S., Udomsangpetch R. et al.* An update of circulating rare cell types in healthy adult peripheral blood: Findings of immature erythroid precursors // *Ann. Transl. Med.* 2018. V. 6. № 20. P. 406. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.04>
63. *Levine R.F., Eldor A., Shoff P.K. et al.* Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs // *Eur. J. Haematol.* 1993. V. 51. № 4. P. 233–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00637.x>
64. *Bethel K., Lutgen M.S., Damani S. et al.* Fluid phase biopsy for detection and characterization of circulating endothelial cells in myocardial infarction // *Phys. Biol.* 2014. V. 11. № 1. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/11/1/016002>
65. *Воробьев А.И., Бриллиант М.Д., Савченко В.Г.* Острые лейкозы // *Руководство по гематологии. В 3 томах. Т. 1. М.: ООО “Медико-технологическое предприятие “Ньюдиамед”, 2022. P. 175–241*
66. *Suga H., Rennert R.C., Rodrigues M. et al.* Tracking the elusive fibrocyte: Identification and characterization of collagen-producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing // *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2014. V. 32. № 5. P. 1347–1360. <https://doi.org/10.1002/stem.1648>
67. *Heukels P., van Hulst J. A. C., van Nimwegen M. et al.* Fibrocytes are increased in lung and peripheral blood of patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *Respir. Res.* 2018. V. 19. № 1. P. 90. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0798-8>
68. *Buenrostro J.D., Giresi P.G., Zaba L.C. et al.* Transposition of native chromatin for multimodal regulatory analysis and personal epigenomics // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 12. P. 1213–1218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
69. *Sollberger G., Tilley D.O., Zychlinsky A.* Neutrophil extracellular traps: the biology of chromatin externalization // *Dev. Cell.* 2018. V. 44. № 5. P. 542–553. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>
70. *Neubert E., Meyer D., Rocca F. et al.* Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release: 1 // *Nat. Commun.* Nature Publ. Group, 2018. V. 9. № 1. P. 3767. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06263-5>
71. How do granulocytes affect my ATAC (standalone or multiome) data? [Electronic resource] // *10X Genomics.* URL: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360046631331-How-do-granulocytes-affect-my-ATAC-standalone-or-Multiome-data-> (accessed: 31.05.2023)
72. *Dagur P.K., McCoy J.P.* Collection, storage, and preparation of human blood cells // *Curr. Protoc. Cytom.* 2015. V. 73. P. 5.1.1–5.1.16. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0501s73>
73. *Böyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g // *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 1968. V. 97. P. 77–89.
74. *Dainiak M.B., Kumar A., Galaev I.Yu. et al.* Methods in cell separations // *Cell separation: fundamentals, analytical and preparative methods* / ed. Kumar A., Galaev I.Y., Mattiasson B. Berlin; Heidelberg: Springer, 2007. P. 1–18. [https://doi.org/10.1007/10\\_2007\\_069](https://doi.org/10.1007/10_2007_069)
75. *Zaret K.* Micrococcal nuclease analysis of chromatin structure // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2005. Chapter 21. P. Unit 21.1. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2101s69>
76. *Pajoro A., Muiño J.M., Angenent G.C. et al.* Profiling nucleosome occupancy by MNase-seq: Experimental protocol and computational analysis // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1675. P. 167–181. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7318-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7318-7_11)
77. *Chung H.-R., Dunkel I., Heise F. et al.* The effect of micrococcal nuclease digestion on nucleosome positioning data // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015754>
78. *Boyle A.P., Davis S., Shulha H.P. et al.* High-resolution mapping and characterization of open chromatin across

- the genome // *Cell*. 2008. V. 132. № 2. P. 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.014>
79. *Levy A., Noll M.* Chromatin fine structure of active and repressed genes // *Nature*. 1981. V. 289, № 5794. P. 198–203. <https://doi.org/10.1038/289198a0>
  80. *Song L., Crawford G.E.* DNase-seq: A high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells // *Cold Spring Harb Protoc*. 2010. № 1559-6095 (Electronic). P. pdb.prot5384. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5384>
  81. *Goryshin I.Y., Reznikoff W.S.* Tn5 in vitro transposition // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. № 13. P. 7367–7374. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7367>
  82. *Adey A., Morrison H.G., Asan et al.* Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition // *Genome Biol*. 2010. V. 11. № 12. P. R119. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-r119>
  83. *Giroux N.S., Ding S., McClain M.T. et al.* Differential chromatin accessibility in peripheral blood mononuclear cells underlies COVID-19 disease severity prior to seroconversion: 1 // *Sci. Rep. Nature Publ. Group*, 2022. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15668-8>
  84. *Simon J.M., Giresi P.G., Davis I.J. et al.* Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA // *Nat. Protoc*. 2012. V. 7. № 2. P. 256–267. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.444>
  85. *Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K. et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. V. 389. № 6648. P. 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
  86. *Bulyk M.L.* Integrative functional genomics // *Genome Biol*. 2004. V. 5. № 7. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-7-331>
  87. *Garvie C.W., Wolberger C.* Recognition of specific DNA sequences // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. № 5. P. 937–946. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00392-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00392-6)
  88. *Brutlag D., Schlehuber C., Bonner J.* Properties of formaldehyde-treated nucleohistone // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 8. P. 3214–3218. <https://doi.org/10.1021/bi00836a013>
  89. *Solomon M.J., Varshavsky A.* Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for in vivo chromatin structures. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1985. V. 82. № 19. P. 6470–6474. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6470>
  90. *Daly M.M., Mirsky A.E., Ris H.* The amino acid composition and some properties of histones // *J. Gen. Physiol*. 1951. V. 34. № 4. P. 439–450. <https://doi.org/10.1085/jgp.34.4.439>
  91. *Giresi P.G., Lieb J.D.* Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements) // *Methods*. 2009. V. 48. № 3. P. 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.003>
  92. *Ren B., Robert F., Wyrick J.J. et al.* Genome-wide location and function of DNA binding proteins // *Science*. 2000. V. 290. № 5500. P. 2306–2309. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2306>
  93. *Iyer V.R., Horak C.E., Scafe C.S. et al.* Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF // *Nature*. 2001. V. 409. № 6819. P. 533–538. <https://doi.org/10.1038/35054095>
  94. *Kim T.H., Dekker J.* ChIP-quantitative Polymerase Chain Reaction (ChIP-qPCR) // *Cold Spring Harb. Protoc*. 2018. V. 2018. № 5. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot082628>
  95. *Barski A., Cuddapah S., Cui K. et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome // *Cell*. 2007. V. 129. № 4. P. 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
  96. *Johnson D.S., Mortazavi A., Myers R.M. et al.* Genome-wide mapping of in vivo protein–DNA interactions // *Science*. 2007. V. 316. № 5830. P. 1497–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1141319>
  97. *Robertson G., Hirst M., Bainbridge M. et al.* Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. № 8. P. 651–657. <https://doi.org/10.1038/nmeth1068>
  98. *Landt S.G., Marinov G.K., Kundaje A. et al.* ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia // *Genome Res*. 2012. V. 22. № 9. P. 1813–1831. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>
  99. *Wells J., Farnham P.J.* Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation // *Methods*. 2002. V. 26. № 1. P. 48–56. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00007-5)
  100. *Bauer U.-M., Daujat S., Nielsen S.J. et al.* Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation // *EMBO Rep*. 2002. V. 3. № 1. P. 39–44. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf013>
  101. *Gilmour D.S., Lis J.T.* In vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster* // *Mol. Cell. Biol.* Taylor & Francis, 1985. V. 5. № 8. P. 2009–2018. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.8.2009-2018.1985>
  102. *Skene P.J., Henikoff S.* An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites // *eLife*. 2017. V. 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21856>
  103. *Kaya-Okur H.S., Wu S.J., Codomo C.A. et al.* CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells: 1 // *Nat. Commun.* Nature Publ. Group. 2019. V. 10. № 1. P. 1930.

- <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5>
104. Skene P.J., Henikoff J.G., Henikoff S. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers: 5 // Nat. Protoc. Nature Publ. Group. 2018. V. 13. № 5. P. 1006–1019. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.015>
  105. Hainer S.J., Bošković A., McCannell K.N. et al. Profiling of pluripotency factors in single cells and early embryos // Cell. 2019. V. 177. № 5. P. 1319–1329. e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.014>
  106. Kaya-Okur H.S., Janssens D.H., Henikoff J.G. et al. Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag // Nat. Protoc. 2020. V. 15. № 10. P. 3264–3283. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0373-x>
  107. Ramani V., Shendure J., Duan Z. Understanding spatial genome organization: Methods and Insights // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2016. V. 14. № 1. P. 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.01.002>
  108. Dekker J., Rippe K., Dekker M. et al. Capturing chromosome conformation // Science. 2002. V. 295. № 5558. P. 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
  109. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture–on-chip (4C) | Nature Genetics [Electronic resource]. 2006. <https://www.nature.com/articles/ng1896>
  110. Dostie J., Richmond T.A., Arnaout R.A. et al. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): A massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements // Genome Res. 2006. V. 16. № 10. P. 1299–1309. <https://doi.org/10.1101/gr.5571506>
  111. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L. et al. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome // Science. 2009. V. 326. № 5950. P. 289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
  112. Forcato M., Nicoletti C., Pal K. et al. Comparison of computational methods for Hi-C data analysis // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 7. P. 679–685. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4325>
  113. Lajoie B.R., Dekker J., Kaplan N. The Hitchhiker’s guide to Hi-C analysis: Practical guidelines // Methods. 2015. V. 72. P. 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.031>
  114. Pal K., Forcato M., Ferrari F. Hi-C analysis: From data generation to integration // Biophys. Rev. 2019. V. 11. № 1. P. 67–78. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0489-1>
  115. Sanborn A.L., Rao S.S.P., Huang S.-C. et al. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2015. V. 112. № 47. P. E6456–6465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>
  116. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov A.A. et al. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains // Genome Res. 2016. V. 26. № 1. P. 70–84. <https://doi.org/10.1101/gr.196006.115>
  117. Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E. et al. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome // Cell. 2012. V. 148. № 3. P. 458–472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.010>
  118. Rao S.S.P., Huntley M.H., Durand N.C. et al. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping // Cell. 2014. V. 159. № 7. P. 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
  119. Ramani V., Cusanovich D.A., Hause R.J. et al. Mapping 3D genome architecture through in situ DNase Hi-C // Nat. Protoc. 2016. V. 11. № 11. P. 2104–2121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.126>
  120. Hsieh T.-H.S., Weiner A., Lajoie B. et al. Mapping nucleosome resolution chromosome folding in yeast by Micro-C // Cell. 2015. V. 162. № 1. P. 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.048>
  121. Krietenstein N., Rando O.J. Mammalian micro-C-XL // Methods Mol. Biol. 2022. V. 2458. P. 321–332. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2140-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2140-0_17)
  122. Hsieh T.-H.S., Cattoglio C., Slobodyanyuk E. et al. Resolving the 3D landscape of transcription-linked mammalian chromatin folding // Mol. Cell. 2020. V. 78. № 3. P. 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.002>
  123. Bonev B., Cohen N.M., Szabo Q. et al. Multiscale 3D genome rewiring during mouse neural development // Cell. 2017. V. 171. № 3. P. 557–572. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.043>
  124. Lando D., Stevens T.J., Basu S. et al. Calculation of 3D genome structures for comparison of chromosome conformation capture experiments with microscopy: An evaluation of single-cell Hi-C protocols // Nucleus. 2018. V. 9. № 1. P. 190–201. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1438799>
  125. Ma X., Ezer D., Adryan B. et al. Canonical and single-cell Hi-C reveal distinct chromatin interaction sub-networks of mammalian transcription factors // Genome Biol. 2018. V. 19. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1558-2>
  126. Liao M., Liu Y., Yuan J. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 // Nat. Med. 2020. V. 26. № 6. P. 842–844. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>
  127. Vabret N., Britton G.J., Gruber C. et al. Immunology of COVID-19: Current state of the science // Immunity. 2020. V. 52. № 6. P. 910–941. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
  128. Li S., Wu B., Ling Y. et al. Epigenetic landscapes

- of single-cell chromatin accessibility and transcriptomic immune profiles of T Cells in COVID-19 patients // *Front. Immunol.* 2021. V. 12.
129. You M., Chen L., Zhang D. et al. Single-cell epigenomic landscape of peripheral immune cells reveals establishment of trained immunity in individuals convalescing from COVID-19: 6 // *Nat. Cell Biol.* Nature Publ. Group. 2021. V. 23. № 6. P. 620–630. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00690-1>
  130. Zheng Y., Liu X., Le W. et al. A human circulating immune cell landscape in aging and COVID-19 // *Protein Cell.* 2020. V. 11. № 10. P. 740–770. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00762-2>
  131. Yadav A.K., Ghosh S., Kotwal A. et al. Seroconversion among COVID-19 patients admitted in a dedicated COVID hospital: A longitudinal prospective study of 1000 patients // *Med. J. Armed Forces India.* 2021. V. 77. № Suppl 2. P. S379–S384. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2021.06.007>
  132. Huang C., Wang Y., Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *The Lancet.* Elsevier. 2020. V. 395. № 10223. P. 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
  133. Hu L., Yu Y., Huang H. et al. Epigenetic regulation of interleukin 6 by histone acetylation in macrophages and its role in paraquat-induced pulmonary fibrosis // *Front. Immunol.* 2017. V. 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00696>
  134. Russ B.E., Olshansky M., Smallwood H.S. et al. Mapping histone methylation dynamics during virus-specific CD8+ T cell differentiation in response to infection // *Immunity.* 2014. V. 41. № 5. P. 853–865. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.11.001>
  135. Yang X., Rutkovsky A.C., Zhou J. et al. Characterization of altered gene expression and histone methylation in peripheral blood mononuclear cells regulating inflammation in COVID-19 patients // *J. Immunol.* 2022. V. 208. № 8. P. 1968–1977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2101099>
  136. Tang H., Gao Y., Li Z. et al. The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19 // *Clin. Transl. Med.* 2020. V. 10. № 6. P. e200. <https://doi.org/10.1002/ctm2.200>
  137. Zhang S., Amahong K., Sun X. et al. The miRNA: A small but powerful RNA for COVID-19 // *Brief. Bioinform.* 2021. V. 22. № 2. P. 1137–1149. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab062>
  138. Hou H., Li Y., Zhang P. et al. Smoking is independently associated with an increased risk for COVID-19 mortality: A systematic review and meta-analysis based on adjusted effect estimates // *Nicotine Tob. Res.* 2021. V. 23. № 11. P. 1947–1951. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntab112>
  139. Zhang Q., Thakur C., Fu Y. et al. Mdig promotes oncogenic gene expression through antagonizing repressive histone methylation markers // *Theranostics.* Ivyspring Intern. Publ. 2020. V. 10. № 2. P. 602–614. <https://doi.org/10.7150/thno.36220>
  140. Shi J., Thakur C., Zhao Y. et al. Pathological and prognostic indications of the mdig gene in human Lung Cancer // *Cell. Physiol. Biochem.* 2021. V. 55. № S2. P. 13–28
  141. Zhang Q., Wadgaonkar P., Xu L. et al. Environmentally-induced mdig contributes to the severity of COVID-19 through fostering expression of SARS-CoV-2 receptor NRPs and glycan metabolism // *Theranostics.* Ivyspring Intern. Publ. 2021. V. 11. № 16. P. 7970–7983. <https://doi.org/10.7150/thno.62138>
  142. Watanabe Y., Allen J.D., Wrapp D. et al. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike // *Science.* 2020. V. 369. № 6501. P. 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
  143. Dekker J., Marti-Renom M.A., Mirny L.A. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. № 6. P. 390–403. <https://doi.org/10.1038/nrg3454>
  144. Wang R., Lee J.-H., Kim J. et al. SARS-CoV-2 restructures host chromatin architecture: 4 // *Nat. Microbiol.* Nature Publ. Group. 2023. V. 8. № 4. P. 679–694. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01344-8>
  145. Carvalho T., Krammer F., Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: A timeline of immunological insights: 4 // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publ. Group. 2021. V. 21. № 4. P. 245–256. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00522-1>
  146. Tan Z.W., Toong P.J., Guarnera E. et al. Disrupted chromatin architecture in olfactory sensory neurons: Looking for the link from COVID-19 infection to anosmia: 1 // *Sci. Rep.* Nature Publ. Group. 2023. V. 13. № 1. P. 5906. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32896-8>
  147. Kee J., Thudium S., Renner D.M. et al. SARS-CoV-2 disrupts host epigenetic regulation via histone mimicry: 7931 // *Nature.* Nature Publ. Group. 2022. V. 610. № 7931. P. 381–388. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05282-z>
  148. Song L., Wang D., Abbas G. et al. The main protease of SARS-CoV-2 cleaves histone deacetylases and DCP1A, attenuating the immune defense of the interferon-stimulated genes // *J. Biol. Chem.* Elsevier. 2023. V. 299. № 3. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102990>
  149. Marston J.L., Greenig M., Singh M. et al. SARS-CoV-2 infection mediates differential expression of human endogenous retroviruses and long interspersed nuclear elements // *JCI Insight.* 2021. V. 6. № 24.

- <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147170>
150. Wang A., Chiou J., Poirion O.B. et al. Single-cell multiomic profiling of human lungs reveals cell-type-specific and age-dynamic control of SARS-CoV2 host genes // *eLife*. 2020. V. 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.62522>
151. Wei J., Patil A., Collings C.K. et al. Pharmacological disruption of mSWI/SNF complex activity restricts SARS-CoV-2 infection: 3 // *Nat. Genet. Nature Publ. Group*. 2023. V. 55. № 3. P. 471–483. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01307-z>
152. Van Der Made C.I., Simons A., Schuurs-Hoeijmakers J. et al. Presence of genetic variants among young men with severe COVID-19 // *JAMA*. 2020. V. 324. P. 663. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.13719>
153. Conceição-Silva F., Reis C.S.M., De Luca P.M. et al. The immune system throws its traps: Cells and their extracellular traps in disease and protection: 8 // *Cells. Multidisciplinary Digital Publ. Institute*. 2021. V. 10. № 8. <https://doi.org/10.3390/cells10081891>
154. Radermecker C., Detrembleur N., Guiot J. et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19 // *J. Exp. Med*. 2020. V. 217. № 12. <https://doi.org/10.1084/jem.20201012>
155. Middleton E.A., He X.-Y., Denorme F. et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome // *Blood*. 2020. V. 136. № 10. P. 1169–1179. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>
156. Zuo Y., Yalavarthi S., Shi H. et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19 // *JCI Insight*. 2020. V. 5. № 11. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>
157. Ligi D., Giglio R.V., Henry B.M. et al. What is the impact of circulating histones in COVID-19: a systematic review // *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*. 2022. V. 60. № 10. P. 1506–1517. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0574>
158. Hong W., Yang J., Zou J. et al. Histones released by NETosis enhance the infectivity of SARS-CoV-2 by bridging the spike protein subunit 2 and sialic acid on host cells: 5 // *Cell. Mol. Immunol. Nature Publ. Group*. 2022. V. 19. № 5. P. 577–587. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00845-6>
159. Leppkes M., Knopf J., Naschberger E. et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. // *EBioMedicine*, 2020. V. 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102925>

## The Role of Changes in Structure and Dynamics of Chromatin Due to COVID-19

A. E. Bigildeev<sup>1</sup>, V. I. Alekseev<sup>2</sup>, A. K. Gribkova<sup>2</sup>, G. S. Timokhin<sup>3</sup>,  
G. A. Komarova<sup>4</sup>, A. K. Shaytan<sup>2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Hematology, Moscow, 125167 Russia

<sup>2</sup>Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>3</sup>Laboratory of Bioinformatics, Faculty of Computer Science, National Research University Higher School of Economics, Moscow, 109028 Russia

<sup>4</sup>Department of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: shaytan\_ak@mail.bio.msu.ru

The COVID-19 pandemic has become a serious challenge for the healthcare system and the economy of many states, and understanding the molecular mechanisms of the pathogenesis of this disease has become a significant challenge for modern science. At the same time, for the first time, a number of high-precision and high-throughput methods for analyzing molecular processes were available to scientists, including technologies for studying changes in chromatin at the genomic level. In this review, we discuss various modern methods that have been used or can be used to study changes in the structure and dynamics of chromatin during infection with SARS-CoV-2, present the results of currently available studies on the role of these changes in the pathogenesis of COVID-19, and in conclusion we review the currently known molecular mechanisms of chromatin modulation that occur during infection with SARS-CoV-2.

**Keywords:** chromatin, COVID-19, SARS-CoV-2, epigenetics, histones.

УДК 577.21:616.127

## СФЕРА КОМПЕТЕНЦИИ ГЕНОВ МЕНДЕЛЕВСКИХ КАРДИОМИОПАТИЙ

А. Н. Кучер<sup>1</sup>, М. С. Назаренко<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Обзор посвящен анализу сферы компетенции генов менделевских кардиомиопатий (КМП) – гипертрофической, дилатационной, аритмогенной и рестриктивной. По Simple ClinVar патогенные/вероятно патогенные варианты 75 генов приводят к развитию одного или нескольких типов КМП. В то же время для данных генов характерны экспрессия в различных тканях и органах (не только в сердце и сосудах, но и в различных отделах головного мозга, желудочно-кишечного тракта и др.), а также вовлеченность в разнообразные метаболические пути и биологические процессы. Эти данные в целом согласуются с результатами широкогеномных ассоциативных исследований (GWAS). Варианты генов КМП ассоциированы с различными типами КМП и другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, а также оказались информативными в отношении таких патологических состояний как ожирение, различные заболевания костно-мышечной и нервной систем, психические, онкологические, инфекционные заболевания и другие. Помимо патологических состояний полиморфизм генов КМП связан с вариабельностью широкого спектра количественных признаков, в том числе патогенетически значимых для различных многофакторных заболеваний. О неслучайности выявленных ассоциаций генов КМП с многофакторными заболеваниями свидетельствуют: коморбидность КМП с ассоциированными по GWAS заболеваниями или участие последних в качестве симптома, фактора риска развития патологии миокарда, модификатора клинической картины; перекрывание пораженных систем органов и спектра патологий, с которыми ассоциированы частые варианты (по GWAS) и к которым приводят редкие патогенные варианты (по OMIM) генов КМП; подтверждение вовлеченности генов КМП в патогенез патологий других систем органов на молекулярном уровне. Таким образом, представленные в обзоре данные свидетельствуют о широкой сфере компетенции генов первичных КМП, выходящей за рамки сердечно-сосудистой системы, что свидетельствует об актуальности проведения комплексных исследований, направленных на определение причинно-следственных отношений между КМП и патологиями других органов, в том числе и с привлечением молекулярно-генетических данных.

**Ключевые слова:** гены менделевских кардиомиопатий, плейотропные эффекты генов кардиомиопатий, широкогеномные ассоциативные исследования, коморбидность кардиомиопатий и многофакторных заболеваний.

DOI: 10.31857/S0016675824010033

Исследования реализации генетической программы (путь от гена до фенотипа) выявили многогранность эффектов отдельных генов и сложность детерминации функциональных состояний организма и признаков. С одной стороны, фенотипически сходные патологические состояния могут детерминироваться многими генетическими факторами, различающимися по вкладу в конечный фенотип, а с другой, один и тот же ген, как правило, вовлечен в различные метаболические пути и может влиять на фенотипическую изменчивость нескольких признаков, а также определять риск развития разных заболеваний. Кардиомиопатии (КМП) являются ярким

примером сложности формирования патологического фенотипа.

Для первичных гипертрофической (ГКМП) и дилатационной (ДКМП) кардиомиопатий выявлены десятки генов, патогенные/вероятно патогенные (P/LP) варианты которых рассматриваются в качестве причинных, меньшее число таких генов известно для аритмогенной (АКМП) и рестриктивной (РКМП) кардиомиопатий [1]. Несмотря на то что типы КМП в целом различаются по патогенетической значимости отдельных генов, описаны также общие гены и даже патогенные варианты, лежащие в основе

развития разных КМП [1]. При наследственных КМП иногда наблюдают перекрывающиеся фенотипы, изменение клинической картины по мере прогрессирования заболевания, неполную и связанную с возрастом экспрессивность и варьируемую пенетрантность даже в пределах одной семьи, у лиц с одним и тем же патогенным вариантом [2–5]. При этом в большинстве случаев КМП манифестируют в пожилом возрасте, когда у пациентов уже регистрируется бремя других заболеваний как связанных, так и не связанных с сердечно-сосудистой системой [6, 7]. Наличие сопутствующих заболеваний может не только осложнять течение КМП [8, 9], но и провоцировать развитие данной патологии миокарда.

Наряду с первичными известны и вторичные (диабетическая, стресс-индуцированная, лекарственно-индуцированная, перипортальная и др.) КМП [10–12], риск развития которых, как правило, имеет многофакторную природу. Однако патогенные варианты, характерные для первичных КМП, регистрируются также при их вторичных формах и других заболеваниях сердечно-сосудистой системы [13–15], а ГКМП и ДКМП могут развиваться при полигенной детерминации или генетические варианты, относящиеся к категории полиморфных, могут выступать в качестве факторов, усугубляющих риск развития КМП или модифицирующих их клиническую картину [16].

В то же время остается недостаточно изученным вопрос о сфере компетенции генов КМП, в том числе об их потенциальной значимости в формировании факторов риска развития патологии миокарда и сопутствующих заболеваний. Описание плейотропных эффектов генов КМП может представить дополнительные сведения об информативных признаках для своевременной диагностики данной патологии и/или формирования групп риска развития КМП. Следует также отметить, что КМП недостаточно изучены с точки зрения клинических особенностей (проявляющихся, прежде всего, за пределами сердечно-сосудистой системы), что важно для понимания их патогенеза, но такие исследования начинают проводиться [17, 18].

Цель настоящего обзора заключается в анализе сферы компетенции генов первичных КМП с точки зрения их значимости в детерминации изменчивости различных признаков в норме и при развитии заболеваний.

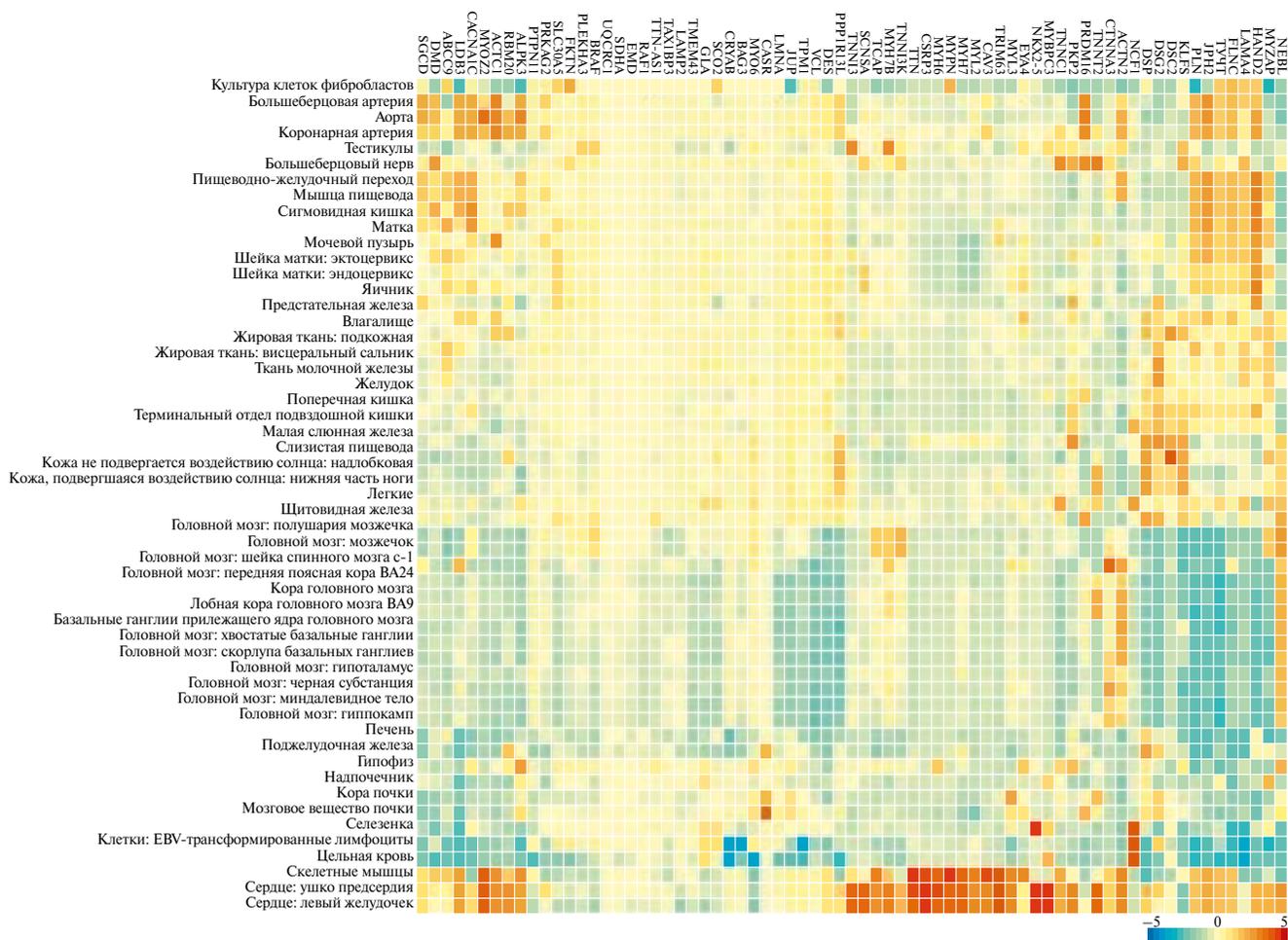
## ИСТОЧНИК ДАННЫХ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ИНСТРУМЕНТЫ

Для достижения поставленной цели привлекались различные информационные и аналитические ресурсы и инструментарии, в том числе разработанные в рамках системной биологии и медицины. В качестве источника данных о генах, патогенные и вероятно патогенные варианты которых вносят вклад в развитие первичных КМП, использована база Simple ClinVar (<https://simple-clinvar.broadinstitute.org/>) [1], здесь и далее дата обращения – февраль 2023 г. Анализ сферы компетенции генов КМП проводился на основании их ассоциированности с заболеваниями многофакторной природы по данным GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) [19], для сравнения привлекались также данные OMIM Catalog (<https://www.omim.org/>) [20] о фенотипических проявлениях моногенных заболеваний, связанных с генами КМП. В ряде случаев при работе с аналитическими инструментами применялись другие источники, что будет указано в дальнейшем. Для визуализации данных и анализа выбранного для исследований перечня генов КМП использовали интернет-ресурсы: STRING (<https://string-db.org/>) [21], Monarch Initiative (<https://monarchinitiative.org/>) [22, 23], Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) [24], FUMA GWAS (<https://fuma.ctglab.nl/>) [25], HumanNet v3 (<https://staging2.inetbio.org/humannetv3/>) [26]. Поиск научных публикаций проведен в зарубежных (PubMed) и отечественных (eLibrary) электронных библиотеках. В качестве основных ключевых слов для поиска публикаций были использованы “гены менделевских кардиомиопатий”.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ ПЕРВИЧНЫХ КАРДИОМИОПАТИЙ

Согласно базе Simple ClinVar, патогенные/вероятно патогенные варианты 75 генов могут приводить к одной из форм первичных КМП: для ГКМП указаны 40 таких генов, для ДКМП – 50 генов, для правожелудочковой АКМП – 11 генов, для РКМП – 7 генов; среди данных генов есть как специфичные для одного типа КМП, так и общие для двух и более клинических типов (Приложение; табл. 1). Большинство генов КМП являются белок-кодирующими, только два относятся к категории генов некодирующих РНК – *FLNC-AS1* и *TTN-AS1*.

Включенные в исследование гены КМП локализованы на большинстве аутосом (за исключе-



**Рис. 1.** Теплокарта, отражающая уровень экспрессии генов КМП (тканеспецифичные паттерны экспрессии, основанные на данных GTEx v6 RNA-seq8, проанализированы с использованием ресурса FUMA GWAS [25]). Приведены нормированные значения уровня экспрессии.

нием хромосом 8, 16 и 21), а также на хромосоме X и на мтДНК. Наиболее “нагружены” генами КМП хромосомы 3 (9 генов), 1 и 10 (по семь генов), по пять генов расположено на хромосомах 6, 7, 12, 15 и X; в митохондриальном геноме локализованы два гена (MT-TG, MT-TI).

Согласно GTEx Consortium привлеченные к рассмотрению гены КМП экспрессируются в 54 тканях [27], но, как правило, на невысоком уровне, даже в миокарде и скелетных мышцах (рис. 1). На относительно высоком уровне экспрессия в сердце наблюдается для генов *MYH6*, *MYH7*, *MYH9*, *MYH10*, *MYH11*, *MYH12*, *MYH13*, *MYH14*, *MYH15*, *MYH16*, *MYH17*, *MYH18*, *MYH19*, *MYH20*, *MYH21*, *MYH22*, *MYH23*, *MYH24*, *MYH25*, *MYH26*, *MYH27*, *MYH28*, *MYH29*, *MYH30*, *MYH31*, *MYH32*, *MYH33*, *MYH34*, *MYH35*, *MYH36*, *MYH37*, *MYH38*, *MYH39*, *MYH40*, *MYH41*, *MYH42*, *MYH43*, *MYH44*, *MYH45*, *MYH46*, *MYH47*, *MYH48*, *MYH49*, *MYH50*, *MYH51*, *MYH52*, *MYH53*, *MYH54*, *MYH55*, *MYH56*, *MYH57*, *MYH58*, *MYH59*, *MYH60*, *MYH61*, *MYH62*, *MYH63*, *MYH64*, *MYH65*, *MYH66*, *MYH67*, *MYH68*, *MYH69*, *MYH70*, *MYH71*, *MYH72*, *MYH73*, *MYH74*, *MYH75*, *MYH76*, *MYH77*, *MYH78*, *MYH79*, *MYH80*, *MYH81*, *MYH82*, *MYH83*, *MYH84*, *MYH85*, *MYH86*, *MYH87*, *MYH88*, *MYH89*, *MYH90*, *MYH91*, *MYH92*, *MYH93*, *MYH94*, *MYH95*, *MYH96*, *MYH97*, *MYH98*, *MYH99*, *MYH100*. Среди генов КМП есть и гены с низким уровнем экспрессии (например, гены *KLF5*, *MYO6*, *BRAF* и др.). С другой стороны, гены *NEBL* и *ACTN2* на уровне выше средних значений экспрессируются в различных отделах головного мозга, а *HAND2*, *LAMA4*, *SACNAIC* – в тканях артерий и различных отделах кишечника и т.д.

Уровень экспрессии генов в клетках и тканях может меняться в ходе онтогенеза и при развитии патологических процессов. Например, в миокарде экспрессия генов *MYH6* и *MYH7* различается на разных стадиях онтогенеза и изменяется при развитии КМП [28, 29]; уровень экспрессии гена *BAG3* в центральной нервной системе (нейронах, коре головного мозга и гиппокампе) стабилен у мышей молодого и среднего возраста, но вариабелен у старых мышей [30]. Тот факт, что гены КМП экспрессируются в разных тканях, на разных этапах онтогенеза, предполагает, что нарушение (изменение) их структуры и/или функции может сказаться на физиологическом состоянии различных клеток и систем органов.

#### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ГЕНОВ КМП

Ожидаемым является участие генов КМП в биологических процессах и метаболических

путях, важных для развития и работы сердца и мышечной системы, но функциональная значимость данных генов шире (рис. 2). Гены КМП вовлечены в различные процессы (например, в регуляцию АТФ-зависимой активности (12% генов), транспорт ионов металлов (14.67%), в поддержание клеточного гомеостаза (16%), в фокальную (9.33%) и эпителиальную межклеточную (4%) адгезию, в негативную регуляцию локализации протеинов на клеточной поверхности и др.), значимы для таких процессов как рост, развитие и поддержание нормального функционирования организма (в частности, в поддержание гомеостаза глюкозы – 8% генов, в развитие органов чувств – 12%, а также в детерминацию роста, в сигнальный путь апелина и др.), регулируют ответ на стимулы (на ионы кальция, активные формы кислорода), значимы для развития патологических состояний (таких как пилоцитарная астроцитомы).

Белки, кодируемые генами КМП, задействованы в различных метаболических процессах, связанных с ионами металлов. Согласно GO Ontology, гены КМП вовлечены в регуляцию транспорта ионов (GO:0010959 – 10 генов), в ответ на ионы металлов (GO:0010038 – 9 генов), гомеостаз ионов металлов (GO:0055065 – 10 генов), клеточный гомеостаз ионов металлов (GO:0006875 – 9 генов), всего – 20 генов. В целом, согласно UniProt (<https://www.uniprot.org/>) [31], практически 50% белков (35 из 72 белков), кодируемых

генами КМП, так или иначе связаны с ионами металлов, в том числе используют их в качестве лигандов/кофакторов (Приложение). Наиболее часто белки, кодируемые генами КМП, связаны с ионами цинка и кальция, реже – магния, меди, натрия и калия. При нарушении структуры и/или функции генов КМП (соответственно кодируемых ими белков) может увеличиваться риск развития дисбаланса по уровню данных эссенциальных биометаллов или будет неэффективным функционирование белков вследствие недостатка лигандов/кофакторов, что, в свою очередь, увеличит риск развития широкого спектра заболеваний [32–34]. Как дефицит, так и избыток эссенциальных металлов может привести к возникновению различных патологических состояний в организме, в том числе к неврологическим патологиям (болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона), расстройствам психики, сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям, диабету и др. [32, 33].

Согласно аналитическому инструменту STRING [21], гены КМП (анализ проведен для 71 гена, за исключением генов некодирующих РНК и генов мтДНК) вовлечены в 195 биологических процессов (в т.ч. обогащены в 114 процессах) и 39 молекулярных функций (обогащены в 24 функциях), связаны с 48 компонентами клеток (по Gene Ontology) и 540 фенотипами человека, в т.ч. обогащены в 364 фенотипах (по Monarch).



**Рис. 2.** Биологические процессы и метаболические пути, обогащенные генами КМП (визуализация с использованием Metascape [24]). Источники для оценки обогащения: GO – по GO Biological Processes; WP – по WikiPathways; hsa – по KEGG Pathway.

Вовлеченность в широкий круг метаболических процессов белков, кодируемых генами КМП, также предполагает их участие в разнообразных патологических процессах. С этой целью проведен анализ участия генов КМП в формировании риска развития различных заболеваний многофакторной природы и в детерминации вариабельности признаков (в том числе патогенетически значимых).

### РОЛЬ ГЕНОВ КМП В РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ И ЗАБОЛЕВАНИЙ МНОГОФАКТОРНОЙ ПРИРОДЫ

В случае кандидатного подхода при изучении генетической компоненты различных заболеваний и признаков исходят из уже известных для некоторого белка/гена метаболических путей, особенностей функции в норме или при патологии. По сравнению с таким подходом широкогеномные ассоциативные исследования (GWAS) обладают тем преимуществом, что позволяют расширить спектр потенциально значимых генов для анализируемых фенотипов. При проведении GWAS среди генов КМП не изучались только гены мтДНК – *MT-TG* и *MT-TI*. В результате проведения GWAS 69 генов КМП были отнесены к категории ассоциированных с разными признаками (в том числе диагностическими и патогенетически значимыми) и заболеваниями различных систем органов, всего ассоциации зарегистрированы с более чем 600 признаками [19].

По данным GWAS гены КМП оказались по-разному “нагружены” ассоциациями. Не было зарегистрировано ассоциаций только для генов *FLNC-AS1*, *GLA*, *TAFAZZIN* и *PLN*. Для ряда генов зарегистрированы единичные ассо-

циации: для *EMD* – со средним объемом эритроцита, для *TNNI3* – с количеством моноцитов, для *TAX1BP3* – с уровнем Tax1-связывающего белка 3 при хронической болезни почек с артериальной гипертензией и без сахарного диабета.

В то же время для многих генов КМП выявлен широкий спектр заболеваний (и признаков) различных систем органов, с которыми были ассоциированы один или несколько SNP (Приложение). Среди таких генов – *CACNA1C*, *CASR*, *CTNNA3*, *EYA4*, *JPH2*, *MYBPC3*, *MYL2*, *MYPN*, *NEBL*, *PRDM16*, *PRKAG2*, *PTPN11*, *RAF1*, *SGCD*, *TTN* и *TTN-AS1* (табл. 2). Для данных генов установлены ассоциации с заболеваниями и признаками, затрагивающими не только сердечно-сосудистую, но и другие системы органов.

SNP 25 из 73 проанализированных при проведении GWAS генов КМП были ассоциированы с заболеваниями сердечно-сосудистой системы (табл. 3). Прежде всего следует отметить ассоциированность ряда SNP с КМП (SNP генов *FLNC*, *TTN*, *TTN-AS1* – с ДКМП, гена *ALPK3* – с ГКМП, *BAG3* – с ДКМП, идиопатической ДКМП, ГКМП, саркомер-негативной ГКМП – всего пять генов). SNP 13 генов (*CTNNA3*, *EYA4*, *HAND2*, *MYH6*, *MYH7*, *MYZAP*, *NEBL*, *NKX2-5*, *PKP2*, *RBM20*, *SCN5A*, *TTN*, *TTN-AS1*) оказались информативными при исследовании различных аритмий. Для полиморфных вариантов 51 гена зарегистрированы ассоциации с другими патологиями сердечно-сосудистой системы: с сердечной недостаточностью (*ACTN2*, *BAG3*, *FLNC*, *RAF1*, *TTN*, *TTN-AS1*), артериальной гипертензией (*CTNNA3*, *MYL2*, *MYO6*, *PRDM16*), инсультом (*NKX2-5*, *PRDM16*, *RBM20*, *TTN*, *TTN-AS1*), инфарктом миокарда (*NKX2-5*, *PRDM16*),

**Таблица 1.** Гены, в которых зарегистрированы патогенные/вероятно патогенные варианты, приводящие к развитию различных КМП (по [1])

Тип КМП	Гены
ГКМП	<i>ALPK3</i> , <i>BRAF</i> , <i>CACNA1C</i> , <i>CASR</i> , <i>CAV3</i> , <i>GLA</i> , <i>JPH2</i> , <i>MT-TG</i> , <i>MYH7B</i> , <i>MYL2</i> , <i>MYL3</i> , <i>MYO6</i> , <i>MYOZ2</i> , <i>NCF1</i> , <i>PRKAG2</i> , <i>PTPN11</i> , <i>SLC30A5</i> , <i>TRIM63</i> , <i>UQCRC1</i>
ДКМП	<i>ABCC9</i> , <i>BAG3</i> , <i>DMD</i> , <i>EMD</i> , <i>EYA4</i> , <i>FKTN</i> , <i>HAND2</i> , <i>KLF5</i> , <i>LAMA4</i> , <i>LDB3</i> , <i>MYPN</i> , <i>MYZAP</i> , <i>NEBL</i> , <i>NKX2-5</i> , <i>PLEKHA3</i> , <i>PPP1R13L</i> , <i>PRDM16</i> , <i>RBM20</i> , <i>SCN5A</i> , <i>SCO2</i> , <i>SDHA</i> , <i>SGCD</i> , <i>TAFAZZIN</i> , <i>TNNI3K</i> , <i>TTN-AS1</i>
АКМП	<i>CTNNA3</i> , <i>DSC2</i> , <i>JUP</i> , <i>PKP2</i> , <i>TAX1BP3</i>
РКМП	<i>FLNC-AS1</i>
ГКМП, ДКМП	<i>ACTC1</i> , <i>CSR3P3</i> , <i>LAMP2</i> , <i>MT-TI</i> , <i>MYBPC3</i> , <i>MYH6</i> , <i>NEXN</i> , <i>PLN</i> , <i>RAF1</i> , <i>TCAP</i> , <i>TNNC1</i> , <i>TPM1</i> , <i>VCL</i>
ДКМП, АКМП	<i>DSG2</i> , <i>DSP</i>
ДКМП, РКМП	<i>CRYAB</i> , <i>FLNC</i>
ГКМП, ДКМП, АКМП	<i>ACTN2</i> , <i>DES</i> , <i>LMNA</i> , <i>TMEM43</i>
ГКМП, ДКМП, РКМП	<i>MYH7</i> , <i>TNNI3</i> , <i>TNNT2</i> , <i>TTN</i>

Таблица 2. Примеры наиболее плейотропных генов КМП по данным GWAS

Гены	Число ассоциаций – число ассоциированных SNP по GWAS	Сердечно-сосудистая система	ЦНС	Костно-мышечная система	Аллергические и аутоиммунные болезни	Бронхолегочная система	Органы зрения	Органы слуха	Эндокринная система и метаболические нарушения	Онкозаболевания	Мочевыделительная система	ЖКТ	Кожа и придатки	Биохимические маркеры	Показатели крови/клеточные компоненты крови	Инфекции/микробиом	Ответ на прием лекарственных препаратов	Прочие
Всего ассоциированных генов		52	45	50	18	21	11	2	23	19	24	21	6	55	28	24	22	17
<i>SACNA1C</i>	193–93	X	X	X	X	X	X			X				X	X	X	X	X
<i>CASR</i>	65–45	X	X	X	X				X		X		X	X	X	X	X	X
<i>CTNNA3</i>	139–115	X	X	X	X	X	X		X	X		X		X		X	X	X
<i>EYA4</i>	104–62	X	X	X	X	X		X			X	X		X	X		X	X
<i>JPH2</i>	53–21	X	X	X		X					X	X		X	X	X	X	
<i>MYBPC3</i>	108–23	X	X	X	X		X		X		X	X		X	X		X	X
<i>MYL2</i>	28–15	X	X						X	X	X	X		X	X	X	X	X
<i>MYPN</i>	65–38	X	X	X		X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	
<i>NEBL</i>	62–49	X	X	X		X	X		X	X	X			X		X	X	X
<i>PRDM16</i>	178–86	X	X	X	X	X	X		X	X		X		X	X		X	X
<i>PRKAG2</i>	168–90	X	X				X		X	X	X			X	X	X	X	
<i>PTPN11</i>	113–26	X	X	X	X	X			X	X	X			X	X		X	X
<i>RAF1</i>	35–20	X	X	X	X				X			X	X	X	X	X		
<i>SGCD</i>	87–61	X	X	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X	X
<i>TTN</i>	70–41	X	X	X		X			X	X	X			X		X	X	
<i>TTN-AS1</i>	58–33	X	X	X		X				X				X		X		

Примечание. Знаком “X” отмечены ячейки, когда для соответствующих генов выявлены ассоциации с признаками (в том числе патогенетически значимыми) соответствующих систем органов или групп патологий и признаков. Перечень ассоциированных SNP и признаков – см. GWAS Catalog [19].

ишемической болезнью сердца (*NEBL*, *LMNA*, *MYL2*, *SGCD*), синдромом слабости синусового узла (*TTN*), аневризмой коронарной артерии при болезни Кавасаки (*NEBL*), аневризмой грудного отдела аорты (*CTNNA3*), пролапсом митрального клапана (*ALPK3*, *BAG3*, *RBM20*), артериитом Такаясу (*CAV3*), ревмокардитом (*CTNNA3*), варикозным расширением вен (*JUP*), венозной тромбоэмболией (*NEBL*) и др. [19].

Помимо патологических состояний сердечно-сосудистой системы, полиморфные варианты генов КМП оказались значимыми в определении вариабельности широкого спектра ЭКГ-параметров (SNP 28 генов) и Эхо-кардиографических показателей (SNP 16 генов), различных параметров артериального давления (SNP 28 генов), кардиологически информативных биохимических признаков, включая липидные показатели, уровни сердечных тропонинов I и T (SNP 30 генов) (табл. 3). В целом на момент анализа данных GWAS для SNP 52 генов КМП зарегистрированы ассоциации с каким-либо фенотипом сердечно-сосудистой системы.

Кроме сердечно-сосудистой системы при проведении GWAS зарегистрированы ассоциации с фенотипами нервной (45 генов), костно-мышечной (50 генов) систем, с широким спектром биохимических показателей (55 генов), признаками и патологиями бронхо-легочной, иммунной, мочеполовой, эндокринной систем органов, желудочно-кишечного тракта, с компонентами клеточного состава крови, а также с ответом на прием лекарственных препаратов и некоторыми другими признаками (Приложение; табл. 2; см. также [19]).

SNP 49 генов были ассоциированы с разными антропометрическими показателями (в том числе с ростом – 34 гена, ожирением и антропометрическими показателями, значимыми для оценки ожирения – 34 гена, с аппендикулярной мышечной массой – семь генов), SNP 10 генов – с патологией костно-мышечной системы (в том числе – с подростковым идиопатическим сколиозом, несиндромальной расщелиной губы и неба, с хронической распространенной мышечно-скелетной болью), SNP 9 генов – с минеральной плотностью костей [19]. При этом для двух

из девяти ассоциированных с минеральной плотностью кости генов кальций выступает в качестве лиганда (*CACNA1C* и *TTN*) [19, 31]. Помимо ассоциаций с пороками развития лица (SNP четырех генов ассоциированы с расщелиной губы и неба – *ABCC9*, *PTPN11*, *SGCD* и *TPM1*), полиморфные варианты ряда генов КМП (*CTNNA3*, *DMD*, *EYA4*, *FKTN*, *HAND2*, *PRDM16*, *SCN5A*, *TTN* и *TTN-ASI*) оказались вовлечены в формирование изменчивости различных морфологических признаков лицевой области.

Среди признаков/патологий нервной системы ассоциации генов КМП (Приложение) наблюдали для структурных особенностей мозга и его отделов – девять генов (*ABCC9*, *CAV3*, *EYA4*, *MYZAP*, *PRDM16*, *PRKAG2*, *SGCD*, *TPM1*, *VCL*); биохимических маркеров, характеризующих функцию мозга и центральной нервной системы, – семь генов (*ACTC1*, *BRAF*, *EYA4*, *JPH2*, *MYBPC3*, *NEBL*, *VCL*); особенностей поведения, зависимостей (никотиновая, алкогольная, опиоидная), пищевых предпочтений/чувствительности к пищевым компонентам – 23 гена (*ACTN2*, *CACNA1C*, *CAV3*, *CTNNA3*, *MYH7B*, *MYL2*, *MYO6*, *RAF1* и др.); когнитивных способностей, интеллектуального и образовательного уровня – 24 гена (*ACTN2*, *CASR*, *DMD*, *DSP*, *FKTN*, *LMNA*, *UQCRC1* и др.); психических и неврологических нарушений, патологии головного мозга (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, депрессия, шизофрения и др.) – 27 генов (*BAG3*, *CACNA1C*, *CAV3*, *CTNNA3*, *DMD*, *DSG2*, *JUP*, *LAMA4*, *NEBL*, *TTN* и др.); хронотипов и нарушения сна – девять генов (*CACNA1C*, *CAV3*, *CTNNA3*, *KLF5*, *NEBL* и др.) [19]. С большим числом неврологических заболеваний и признаков, связанных с разными (четырьмя и более) вышеперечисленными категориями, оказались ассоциированы гены *CACNA1C*, *CAV3*, *CTNNA3*, *EYA4*, *MYBPC3*, *NEBL*, *PRDM16* и *SGCD*.

С признаками других систем органов (бронхолегочной, мочевыделительной и эндокринной систем, желудочно-кишечного тракта, органов зрения и слуха) ассоциации генов КМП регистрировались реже. Например, SNP 18 генов (*BRAF*, *CASR*, *DMD*, *JUP*, *MYBPC3*, *MYOZ2*, *MYPN*, *PRDM16* и др.) были ассоциированы с сахарным диабетом типа 2 и (чаще) клинически значимыми количественными признаками (уровень гликированного гемоглобина, глюкозы и др.) при данном заболевании. SNP генов *ACTC1*, *CACNA1C*, *CTNNA3*, *KLF5*, *LDB3*, *MYBPC3*, *MYPN*, *NEBL*, *PRDM16*, *PRKAG2* и *SGCD* пока-

зали ассоциации с различными параметрами и функциональными состояниями глаз [19]. Ряд генов КМП по GWAS показали ассоциации как с неалкогольной жировой болезнью печени (гены *MYL2*, *RAF1*), так и с биохимическими показателями, изменяющимися при развитии патологического процесса в печени (с аланинаминотрансферазой – *MYH7B*, *PLEKHA3*; с аспартатаминотрансферазой – *BAG3*, *MYBPC3*, *PLEKHA3*; с гамма-глутамилтранспептидазой – *KLF5*; со щелочной фосфатазой – *PTPN11*, *MYBPC3*; с уровнем билирубина – *ABCC9*, *PTPN11*) [19]. SNP ряда генов ассоциированы с признаками и патологией кожи и ее придатков, в том числе генов *CASR* и *MYPN* – с псориазом.

Биохимические признаки, с которыми установлены ассоциации с SNP генов КМП, представлены широким спектром показателей, отражающих функционирование разных систем органов: уровень различных фракций липидов; показатели углеводного обмена; признаки, отражающие функционирование почек, печени и др. Кроме того, зарегистрированы многочисленные ассоциации с форменными элементами крови: эритроцитами/ретикулоцитами, тромбоцитами, лейкоцитами (и их типами – эозинофилами, нейтрофилами, лимфоцитами, моноцитами), а также функционально значимыми особенностями данных типов клеток [19].

Согласно GWAS, для генов КМП установлены ассоциации как с инфекционными патологиями (ген *CACNA1C* – с гепатитом В, гены *CTNNA3*, *TTN*, *TTN-ASI* – с числом копий вируса Эпштейна–Барр в лимфобластоидных клеточных линиях и др.), так и с лейкоцитами и их клеточными фракциями (ассоциированы варианты генов *EYA4*, *HAND2*, *JPH2*, *KLF5*, *LMNA*, *MYL2*, *NKX2-5*, *PRDM16*, *PTPN11*, *SGCD*, *TPM1*) [19]. SNP каждого третьего гена моногенных КМП были ассоциированы с инфекционными заболеваниями (в т.ч. COVID-19, грипп H1N1, гепатит В, ВИЧ-1) и параметрами микробиома кишечника [19].

С заболеваемостью COVID-19 были ассоциированы SNP генов *CTNNA3*, *DMD*, *LAMP2*, *MYL2*, *RAF1*, с тяжестью течения – *JUP*, с госпитализацией при COVID-19 – *ABCC9*, *DMD*, *MYZAP*, *RAF1*, со смертностью от данной инфекции – *CTNNA3*. В данном случае можно предположить, что структурно-функциональные особенности в генах КМП (прежде всего за счет регуляторных SNP) могут выступать в качестве

**Таблица 3.** Схематическое представление ассоциации генов КМП с фенотипами сердечно-сосудистой системы по GWAS

Ген	КМП	Аритмии	Иная патология сердечно-сосудистой системы	Показатели артериального давления	ЭКГ-параметры	ЭхоКГ-параметры	Пороки развития сердечно-сосудистой системы	Клинически значимые для сердечно-сосудистой системы биохимические признаки
<i>ABCC9</i>				X		X		
<i>ACTN2</i>			X		X	X		
<i>ALPK3</i>	X		X		X	X		
<i>BAG3</i>	X		X	X	X	X		X
<i>CACNA1C</i>				X	X	X		
<i>CASR</i>				X	X			X
<i>CAV3</i>			X					X
<i>CRYAB</i>					X			X
<i>CSRP3</i>				X				
<i>CTNNA3</i>		X	X	X	X			X
<i>DES</i>				X	X			
<i>DSP</i>				X	X	X		X
<i>EYA4</i>		X		X				X
<i>FKTN</i>								X
<i>FLNC</i>	X		X					
<i>HAND2</i>		X						
<i>JPH2</i>			X	X				
<i>JUP</i>			X	X	X			
<i>LAMA4</i>								X
<i>LDB3</i>					X			X
<i>LMNA</i>			X	X				X
<i>MYBPC3</i>			X	X	X			X
<i>MYH6</i>		X	X	X	X	X		
<i>MYH7</i>		X			X	X		
<i>MYH7B</i>					X		X	
<i>MYL2</i>			X					X
<i>MYL3</i>				X	X			X
<i>MYO6</i>			X					
<i>MYOZ2</i>					X			X
<i>MYPN</i>				X				X
<i>MYZAP</i>		X						X
<i>NEBL</i>		X	X	X		X	X	X
<i>NEXN</i>				X				
<i>NKX2-5</i>		X	X	X	X	X		
<i>PKP2</i>		X			X			
<i>PLEKHA3</i>						X		
<i>PPP1R13L</i>								X
<i>PRDM16</i>			X	X	X			X
<i>PRKAG2</i>			X	X				X
<i>PTPN11</i>			X	X		X		X
<i>RAF1</i>			X		X			X
<i>RBM20</i>		X	X		X			

Окончание таблицы на стр. 50

Таблица 3 (окончание)

<i>SCN5A</i>		X	X	X	X			
<i>SGCD</i>			X	X				X
<i>TCAP</i>			X					X
<i>TNNC1</i>								X
<i>TNNT2</i>					X	X		X
<i>TPM1</i>				X				X
<i>TRIM63</i>					X			X
<i>TTN</i>	X	X	X	X	X	X		X
<i>TTN-AS1</i>	X	X	X	X	X	X		
<i>VCL</i>				X	X	X		X
ВСЕГО	5	13	25	28	28	16	2	30

важного фактора, определяющего ответ на такой экзогенный стимул, как кардиотропные вирусы, что может детерминировать риск развития КМП у пациентов, в том числе и не несущих патогенные варианты.

Кроме того, SNP 22 генов КМП показали ассоциации с ответом на прием лекарственных препаратов, включая препараты, влияющие на ренин-ангиотензиновую систему, блокаторы кальциевых каналов, бронхолитики, антидепрессанты, статины, а также лекарственные средства, используемые для лечения инфекционных, неврологических, онкологических заболеваний и др. SNP 12 генов КМП оказались ассоциированы либо с онкозаболеваниями, либо с ответом на лечение данных патологий, клиническими особенностями течения болезни или прогнозом. Так, SNP гена *SACNA1C* ассоциированы с ответом на гемцитабин и выживаемостью при раке поджелудочной железы; *CTNNA3*, *MYL3*, *NEBL* – с раком молочной железы, *DMD* – с раком молочной железы и выживаемостью без прогрессирования при эпителиальном раке яичников пациенток, получавших карбоплатин и паклитаксел, *JUP* – с раком пищевода и меланомой, *KLF5* – с колоректальным раком, *LMNA* – с раком желудка, раком яичников и раком легких у курильщиков, *MYH7B* – с меланомой и немеланомным раком кожи, *MYO6* – с раком простаты и т.д. [19].

Понятно, что данные GWAS не дают исчерпывающей информации о сфере компетенции генов КМП, она существенно шире. Так, с помощью инструментов Monarch Initiative [22, 23] показано, что число фенотипов, с которыми ассоциированы отдельные гены КМП, варьирует от 0 до нескольких сотен. В частности для гена *LMNA* таких фенотипов зарегистрировано 450, для *BRAF* – 233, *MYH7* – 179, *SDHA* – 162, *PTPN11* – 160, *FKTN* – 132, *RAF1* – 125, *MYRN* –

113, *TTN* – 113, *NKX2-5* – 111, *MYBPC3* – 104, *ABCC9* – 100 и т.д.; в среднем на один ген КМП приходится 52.7 фенотипа.

Приведенные в текущем разделе данные свидетельствуют о потенциально широкой сфере компетенции генов КМП. Чтобы оценить неслучайность выявленных при проведении GWAS ассоциаций генов КМП с заболеваниями и признаками представляется целесообразным проанализировать, во-первых, значимость ассоциированных признаков/болезней в развитии КМП, во-вторых, возможную функциональную вовлеченность генов КМП (и кодируемых ими белков) в патогенез ассоциированных болезней и детерминацию ассоциированных признаков.

#### ЗНАЧИМОСТЬ ПАТОЛОГИЙ И ПРИЗНАКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ КМП, В ПАТОГЕНЕЗЕ КАРДИОМИОПАТИЙ

Гены КМП оказались ассоциированы со многими признаками/болезнями, которые рассматриваются в качестве факторов риска развития патологий миокарда, факторов, влияющих на клиническую картину (таких как воспаление, нарушение кальциевого обмена, избыточная масса тела, эндокринные нарушения, прием некоторых лекарственных препаратов и др.), а также осложнений КМП.

Сердечная недостаточность (СН), артериальная гипертензия, фибрилляция предсердий, нарушения ритма и проводимости часто регистрируются у пациентов с различными первичными КМП [6, 35, 36]. Некоторые нарушения в работе сердечно-сосудистой системы (в частности нарушения сердечного ритма и другие патологические изменения в работе сердца, выявляемые на ЭКГ) предшествуют развитию классической картины КМП или проявляются в ходе разви-

тия клинической картины заболевания [37–39]. Иногда по данным ЭКГ и визуализации сердца с помощью магнитно-резонансной томографии удается выявить признаки субклинической и ранней стадии ДКМП (наиболее распространенными ранними признаками ДКМП являлись аритмии и нарушения проводимости) [40]. КМП, с одной стороны, являются частой причиной аритмий (фибрилляции предсердий, ФП), с другой – ФП может выступать в качестве осложнения КМП; наличие такого осложнения связано с ухудшением прогноза для ГКМП и ДКМП (но не РКМП) [37].

Нейрогенные нарушения могут выступать в качестве причины развития патологии сердца [41–43]. Благодаря нейровизуализации установлено, что изменения в областях островковой коры, передней поясной извилины и в миндалевидном теле (которые играют важную роль в регуляции центральной вегетативной нервной системы) связаны с аритмией, повреждением миокарда, более высокими уровнями в плазме натрийуретического пептида, катехоламинов и глюкозы [42]. “Влияние” мозга на сердце может проявляться не только в виде увеличения уровня сердечных маркеров, развития аритмии, но и нарушениями реполяризации на электрокардиограмме, некрозом миокарда и вегетативной дисфункцией [41].

Известно также, что кардиальные и/или нейрогенные нарушения могут сопровождать поражения мышц, а при расстройствах, в основном характеризующихся сердечными или нейрогенными отклонениями, регистрируют снижение количества или активности сателлитных клеток скелетных мышц [44]. Эти данные указывают на то, что между сердцем, мышцами и нервной системой существуют сложные структурно-функциональные взаимоотношения, регулируемые в том числе и на генном уровне, и нарушение гомеостаза в одной из систем может привести к патологии в другой системе.

Среди пациентов с КМП (в частности с ГКМП) распространено ожирение, которое оказывает существенное влияние на клиническую картину болезни [45], рассматривается как основной неблагоприятный модификатор пенетрантности, тяжести и клинического течения заболевания ГКМП [46]. J. Robertson с соавт. отметили, что повышенный индекс массы тела у молодых женщин связан с увеличением вероятности развития у них в последующем КМП (осо-

бенно ДКМП), причем риск развития данной патологии наблюдается уже при умеренно повышенной массе тела, тогда как тяжелое ожирение приводит почти к 5-кратному увеличению риска [10]. В метаболические нарушения, в том числе и риск развития ожирения, вовлечены многочисленные гены, в том числе и гены КМП [19].

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) коморбидна с различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы (с диабетической кардиомиопатией, аритмиями, ишемической болезнью сердца, ремоделированием сердца и аортального клапана, кальцификацией митрального кольца, диастолической сердечной дисфункцией) [47] и у пациентов с заболеваниями печени бремя сердечно-сосудистых заболеваний в 2 раза выше (2634.6 на 100 000 человек) по сравнению с лицами без заболеваний печени (1339.7 на 100 000 человек) [48].

Показано, что уровень смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы (в том числе и при КМП) положительно коррелирует с уровнем распространенности псориаза в различных странах [49]. Псориаз (по GWAS ассоциированы *CASR* и *MYPN*) часто сочетается с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в том числе и с ишемической ДКМП, и в случае выявления псориаза индивиды с атеросклерозом, артериальной гипертензией и сахарным диабетом типа 2 имеют более высокий риск развития множественных хронических заболеваний [49, 50]. Интересно, что оптимальный гликемический контроль оказался недостаточным для предотвращения диабетической КМП, возникающей в результате ремоделирования сердца и геометрических изменений, причем оба эти события инициируются изменениями, первоначально происходящими на уровне кардиомиоцитов [51]. При этом каждый четвертый ген КМП показал по данным GWAS (Приложение) связь либо с сахарным диабетом, либо с параметрами углеводного обмена.

Нарушения, связанные с кальцием, рассматриваются в качестве патофизиологических механизмов для различных патологий сердца, включая первичную ГКМП, диабетическую КМП и катехоламинергическую полиморфную желудочковую тахикардию [52, 53]. Многие из генов КМП кодируют белки, функционально связанные с обменом металлов, в том числе и кальция, а также ассоциированы с уровнем минеральной плотности кости.

Кардиотоксичность часто наблюдается при использовании химиотерапии и нейролептиков [54, 55]. Кардиотоксичны химиопрепараты, используемые при лечении онкозаболеваний (например, применение антрациклинов для лечения рака молочной железы сопровождается развитием ДКМП) [11]. Некоторые исследователи отмечают, что кардиотоксичность при применении препаратов, используемых для лечения онкологических заболеваний, наблюдается в 50% случаев [56]. В то же время риск развития лекарственных осложнений у таких пациентов может зависеть и от генетических особенностей, в том числе и генов, определяющих структурно-функциональные особенности миокарда [57], и от наличия редких вариантов в генах КМП – таких как *BAG3*, *LMNA*, *MYH7*, *TNNT2* и *TTN* [11].

Иммунная дисфункция, и в частности, нарушение клеточного иммунитета рассматриваются в качестве важной составляющей патогенеза при ДКМП [58]. Инфекционные заболевания могут влиять на риск развития (или выступать в качестве провоцирующего фактора) заболеваний сердца, включая КМП [12]. Кардиотропные вирусы являются важными факторами окружающей среды в патогенезе “идиопатических” случаев ДКМП [59, 60]. Так, у 31 (54%) пациента с ДКМП был выявлен миокардит, а у 29 (52%) – кардиотропные вирусы (наиболее часто выявлялись парвовирус В19 и вирус герпеса человека типа 6, реже – вирус Эпштейна–Барр, энтеровирус, вирус гепатита С, вирус ветряной оспы), при этом была выявлена связь между воспалением, вызванным большим количеством Т-лимфоцитов, и неблагоприятным прогнозом [60].

Для COVID-19 отмечается взаимозависимость с патологией сердечно-сосудистой системы: ранее существовавшие болезни данной системы увеличивают заболеваемость и смертность от COVID-19, а вновь развивающиеся повреждения сердца возникают в условиях острого COVID-19 у пациентов без ранее существовавших изменений сердца и сосудов [61]. COVID-19 может провоцировать повреждение миокарда, перикардит, коагулопатию, инфаркт миокарда, сердечную недостаточность, аритмии и увеличивает риск неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов в пост-остром периоде; в определенном проценте случаев может развиваться миокардит после вакцинации против COVID-19 (в основном при использовании вакцин на основе РНК) [62, 63]. Отметим, что ряд генов КМП по GWAS ассоциированы с уровнем тромбоцитов, тромбоцитом

и некоторыми тромбоцитарными параметрами (*CACNA1C*, *HAND2*, *JPH2*, *LMNA*, *MYBPC3*, *NEXN*, *PPP1R13L*, *PRDM16*, *TPM1*, *UQCRC1*). D.J. Hammersley с соавт. [64] установили, что заболеваемость COVID-19 пациентов с ДКМП и ГКМП не отличалась от общепопуляционной оценки, но данные пациенты чаще нуждались в госпитализации и у них отмечалось ухудшение физического здоровья после болезни. Есть сообщения о более низкой вероятности диагностики пост-ковидного синдрома или лечения в клинике с длительным COVID у лиц с такими сопутствующими заболеваниями, как КМП, психоз и деменция, а также при злоупотреблении психоактивными веществами [65].

В ряде исследований отмечается наличие мультиморбидности у пациентов с КМП [6, 66]. У лиц с ГКМП чаще диагностировали несколько сопутствующих заболеваний, таких как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет и почечная недостаточность по сравнению с контрольной группой, сопоставимой по полу, возрасту и происхождению [9, 67]. Спектр коморбидных патологий различается в разных возрастных когортах пациентов с ГКМП: у лиц в возрасте старше 45 лет чаще, чем в более молодой выборке пациентов, регистрировались артериальная гипертензия (94.5 и 10.5% соответственно), ожирение (50.6 и 5.3%), сахарный диабет (27.1 и 2.6%), фибрилляция предсердий (29.4 и 2.6%), но у молодых пациентов чаще выявляли нарушение ритма и проводимости сердца и наблюдалась большая частота встречаемости обструктивной ГКМП [6]. Особенности структуры коморбидности могут влиять на риск развития осложнений при КМП [66]. E. Pogran с соавт. в одноцентровом исследовании долгосрочного прогноза у пациентов с кардиомиопатией такоцубо показали, что у этих пациентов более часто регистрировалась смертность от несердечных причин (71.4% всех смертей), особенно злокачественных новообразований (26.5% всех смертей) [68].

Приведенные данные указывают на то, что ассоциированные по GWAS с генами КМП заболевания и признаки находятся в определенной взаимосвязи с кардиомиопатиями. Однако эти наблюдения не исключают вторичности (и соответственно случайности) ассоциаций в связи с частой сочетаемостью ассоциированных патологий/признаков с КМП. Важными представляются экспериментальные, клинические данные и результаты функциональных исследований,

подтверждающих вовлеченность ассоциированных генов КМП в патогенез болезней других систем органов и изменчивость признаков, в том числе и не связанных с функционированием сердечно-сосудистой системы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ВОВЛЕЧЕННОСТИ ГЕНОВ КМП В ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМ ОРГАНОВ

Для некоторых генов КМП установлена вовлеченность в детерминацию не только заболеваний и признаков многофакторной природы, но и моногенных болезней с близкими фенотипическими проявлениями [19, 20]. Как ассоциированность с полиморфными вариантами, так и роль редких патогенных вариантов генов КМП оказались информативными при исследовании не только различных типов КМП, но и аритмий, пороков развития сердца и других органов (в частности лицевых дисморфий), патологий органов чувств (глаз и ушей), нарушений кожи и ее придатков. При этом по данным GWAS SNP генов КМП оказались вовлечены в детерминацию нормальной изменчивости признаков данных систем органов, в том числе – частота сердечного ритма, антропометрические параметры лица. Так, для SNP гена *SCN5A* известны патогенные варианты, приводящие к наследственным заболеваниям, проявляющимся аритмиями (фибрилляция желудочков, семейная, тип 1; Бругада синдром, тип 1; мерцательная аритмия, семейная, тип 10), и полиморфные варианты, ассоциированные с данными патологическими фенотипами и частотой сердечных сокращений [19, 20].

Полиморфные варианты генов КМП *CACNA1C* и *DSP* ассоциированы с мерцательной аритмией и частотой сердечных сокращений соответственно. С частотой сердечных сокращений ассоциированы и SNP других генов КМП (*DES*, *MYH6*, *NKX2-5*, *SCN5A*). При этом к одному и тому же или близкому фенотипу могут приводить редкие патогенные и частые полиморфные варианты одного и того же или разных генов КМП. Например, патогенные варианты гена *EYA4* приводят к аутосомно-доминантной форме глухоты, тип 10 (OMIM 601316), а полиморфные варианты данного гена по GWAS – к возрастному ухудшению и потере слуха. Кроме того, по GWAS к потере слуха предрасполагают SNP гена *MYO6*.

Ряд генов КМП участвуют в формировании риска развития онкозаболеваний различных систем органов по GWAS (*CTNNA3*, *DMD*, *MYL3*, *NEBL* – к раку молочной железы, *JUP* – к раку пищевода, меланоме, *KLF5*, *MYL2* – к колоректальному раку, *LMNA* – к раку легких, желудка, яичников, *MYH7B* – к меланоме и немеланомному раку кожи, *MYO6* – к раку простаты и др.), но общим по OMIM и GWAS является только ген *PTPN11*, соматические мутации в котором приводят к ювенильному миеломоноцитарному лейкозу, а полиморфные варианты проявляют плейотропный эффект в отношении лейомиомы матки или рака молочной железы [19, 20]. Интересно, что некоторые из генов КМП, ассоциированных с онкозаболеваниями (*MYH7B*, *PTPN11*, *DMD*, *LMNA*, *KLF5*, *JUP*), экспрессируются в эмбриональных тканях [69]. Ассоциированность с онкозаболеваниями характерна для многих генов КМП и в ряде случаев была показана их включенность в патогенез болезней. Например, длинная некодирующая РНК *TTN-AS1*, связываясь с мРНК титина (*TTN*), может оказывать проонкогенное действие при многих видах рака, а сверхэкспрессия *TTN-AS1* коррелирует с плохим прогнозом при раке молочной железы, раке легкого, новообразованиях пищеварительной системы, раке репродуктивной системы и др. [70].

Тот факт, что в формирование определенных патологических фенотипов вносят вклад полиморфные варианты не только генов моногенных болезней с близким клиническим фенотипом, но и другие гены КМП, указывает на определенную структурно-функциональную общность данных генов. Действительно, белковые продукты генов КМП формируют функциональные сети межбелковых взаимодействий. По STRING [21] 71 ген КМП (узлы) формируют 683 различных типов связей (ребер) (в среднем на один ген приходится 19.2 связи) при ожидаемом числе взаимодействий 35 (т.е. регистрируется избыточность различных типов межбелковых взаимодействий по сравнению с ожидаемым –  $p < 1.0e-16$ ), средний локальный коэффициент кластеризации равен 0.656. Близкий результат получен и при использовании алгоритмов HumanNet\_v3 [26]: для 70 генов (не вошли в анализ гены *ALPK3*, *FLNC-AS1*, *MT-TG*, *MT-TI*, *TTN-AS1*) в сети HumanNet-XC (составлена с учетом со-цитирования) выявлено 926 связей (по пермутационному тесту  $p < 0.0001$ , AUROC: 0.9598), в сети HumanNet-PI (сеть межбелковых взаимодействий) – 173 связи ( $p < 0.0001$ , AUROC: 0.8433), в сети HumanNet-FN (сеть функциональных межбелковых взаи-

модействий) – 278 связей ( $p < 0.0001$ , AUROC: 0.8599). Приведенные оценки свидетельствуют о том, что включенные в анализ гены КМП характеризуются более сильной связью между собой, чем такого же размера выборки рандомизированных наборов генов (для всех сетей моделей  $p < 0.0001$  по пермутационному тесту), и высокой предсказательной силой согласно ROC-анализу. Это, в свою очередь, позволяет предположить и более широкую сферу компетенции генов, для поиска которых могут быть в дальнейшем использованы как структурные особенности, формируемые кодируемыми генами КМП белками, так и имеющаяся на настоящий момент информация о вовлеченности данных генов в формирование патологий и признаков, как на полигенной, так и на моногенной/олигогенной основе. Это предположение подтверждается клиническими и экспериментальными исследованиями.

Описаны редкие случаи сочетания у детей КМП (ДКМП, ГКМП, смешанный фенотип ДКМП/ГКМП, переходящий в ГКМП по мере прогрессирования), связанной с геном *ALPK3*, и черепно-лицевых скелетных аномалий [2], что не рассматривалось ранее в качестве характерных симптомов для КМП, вызванных патогенными вариантами в данном гене [19]. Ген *TTN* рассматривается в качестве нового кандидата для артрогрипоза 10 типа (врожденного заболевания опорно-двигательной системы, проявляющегося контрактурами суставов, недоразвитием мышц, поражением спинного мозга) на основании особенностей экспрессии и изучения сетей межбелковых взаимодействий *in silico* [71]. Нарушения структурно-функциональных параметров головного мозга (анатомические особенности – корковые и подкорковые объемы, детерминанты объема коркового серого вещества, площади поверхности и толщины коры, объемы билатерального полосатого тела, прецентральных извилин и первичной зрительной области; когнитивно-поведенческие данные) зарегистрированы у детей препубертатного возраста с синдромом Нунан, причем ряд изменений были связаны с увеличением экспрессии гена *PTPN11*, особенно в височной доле головного мозга [72].

Изменения уровня экспрессии генов КМП зарегистрированы при развитии патологий различных систем органов многофакторной природы, причем не только тех состояний/признаков, для которых установлены ассоциации по GWAS. Выявлено изменение уровня экспрессии гена *TTN*

(по GWAS ассоциирован с параметрами функции легких) в легочной ткани мышей при развитии хронической обструктивной болезни, развившейся после воздействия никотином (изменения регистрировались на уровне транскриптов, белка и модификации белков ацетилированием) [73]. У человека в ткани легкого при аденокарциноме наблюдали снижение экспрессии *TTN* и более низкий уровень данного белка был связан с худшей выживаемостью (*TTN* рассматривается в качестве потенциального биомаркера для определения уровней иммунной инфильтрации у пациентов с данной онкопатологией) [74].

*CRYAB* относят к числу возможных маркеров, применимых для профилактики или лечения хронической обструктивной болезни легких, так как данный белок уменьшал вызванное сигаретным дымом воспаление, апоптоз и окислительный стресс в клетках нормального и пораженного бронхиального эпителия человека путем подавления сигнальных путей PI3K/Akt и NF-κB [75]. Экспрессия гена *CRYAB* увеличивается в коре головного мозга при черепно-мозговой травме и рассматривается в качестве возможного маркера реактивного астроглиоза в поврежденной ткани мозга [76]. Уровень экспрессии гена *UQCRC1* (по GWAS ассоциирован с самооценкой математических способностей) изменялся в крови с возрастом [77], в различных отделах головного мозга у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона [78], болезнью Альцгеймера и фатальной семейной бессонницей [79], в образцах крови пациентов с болезнью Альцгеймера [80], в тканях скелетных мышц пожилых здоровых людей при старении опорно-двигательного аппарата и при болезни Альцгеймера [81]. Экспрессия гена *RAF1* изменялась в крови у лиц с болезнью Крона, которая рассматривается в качестве фактора риска болезни Паркинсона, а у лиц с данным неврологическим заболеванием уровень транскрипции коррелировал с тяжестью течения болезни [82]. Примечательно, что в ряде процитированных исследований белки, экспрессия генов которых изменяется при неврологических заболеваниях, относятся к категории узловых (“хабовых”) при рассмотрении функционально значимых сетей межбелковых взаимодействий [78–82].

К категории “хабовых” отнесен также ген *TNNT2*, уровень экспрессии которого был снижен в образцах ткани почечных клубочков пациентов с диабетической нефропатией по сравнению со здоровыми индивидами [83]. При использовании крысиной модели ген *Tmem43*

охарактеризован в качестве нового молекулярного маркера патогенеза экспериментальной диабетической болезни почек [84]. Кроме того, экспрессия *TMEM43* увеличивалась в мононуклеарных клетках периферической крови при ревматоидном артрите [85].

Для ряда генов КМП установлена дифференциальная экспрессия сателлитных клеток скелетных мышц (обеспечивают гомеостаз мышечной ткани, предоставляют миобласты для роста, поддержания, восстановления и регенерации) [44]. Дифференциальная экспрессия наблюдалась для сателлитных клеток при разных категориях нервно-мышечных расстройств (в том числе с преимущественно нейрогенными и сердечными поражениями): при мышечной дистрофии – для *FKTN*, *LMNA*, *CAV3*, *TTN*; при врожденной мышечной дистрофии – для *FKTN*, *LMNA*, при врожденной миопатии – для *ACTN2*, *MYPN*, *TTN*; при дистальной миопатии – для *ACTN2*, *CAV3*, *FLNC*, *TTN*; при миотоническом синдроме – для *CAV3*; при наследственных кардиомиопатиях – для *ABCC9*, *EYA4*, *FKTN*, *JUP*, *NEXN*, *PRKAG2*, *SDHA*, *ACTN2*, *BAG3*, *CAV3*, *CRYAB*, *CTNNA3*, *FLNC*, *LMNA*, *MYPN*, *PKP2*, *TTN*, *VCL*; при заболеваниях двигательных нейронов – для *TTN*; при нейропатиях с поражением двигательных и чувствительных нервов – для *BAG3*, *LMNA* и т.д. Иными словами, гены КМП могут выступать в качестве независимого маркера патологического процесса во внесердечных тканях.

Ряд генов КМП, в том числе связанных с ожирением или признаками ожирения, экспрессируется в жировой ткани [86–89]. Экспрессию гена *PRDM16* регистрировали в висцеральной белой жировой ткани, и уровень экспрессии увеличивался при ее “побурении” [87]. Ген *PRDM16* не только участвует в “побурении” жировой ткани, но может влиять на метаболизм липидов, а также связан с риском развития сахарного диабета [87, 90]. В жировой ткани индивидов с сахарным диабетом типа 2 уровень экспрессии гена *PRDM16* был значительно ниже, чем у лиц с преддиабетом [90]. В висцеральной жировой ткани у женщин с сахарным диабетом уровень белка *STAT5B* был ниже, чем у лиц без этой патологии [86]. У обезьян (яванских макаков) с ожирением, вызванным диетой с высоким содержанием жиров, фруктозы и холестерина, регистрировали аномально высокую экспрессию *PTPN11* и снижение уровня тестостерона [89]. Уровень экспрессии гена *CaSR* изменялся в ткани паразито-

видной железы при гиперпаратиреозе [91].

Изменение экспрессии генов КМП регистрировали при некоторых инфекционных и воспалительных заболеваниях. *TPM1* играет важную роль в регуляции провоспалительного фенотипа микроглии: при воздействии липополисахаридом вызывает воспаление и гибель нейронов в сетчатке через путь PKA/CREB (*TPM1* рассматривается в качестве потенциальной мишени для терапевтического вмешательства при некоторых заболеваниях головного мозга) [92]. Экспрессия *VCL* была снижена в Т-лимфоцитах у пациентов с иммунной тромбоцитопенией [93]. Дифференциально экспрессирующиеся при раке предстательной железы гены КМП *VCL*, *TPM1*, *FLNC* (экспрессия снижена в опухолевой ткани) были в числе девяти наиболее значимых (“хабовых”) генов, связанных с естественными клетками-киллерами, задействованными в модуляции иммунного ответа при данном онкологическом заболевании [94]. Наблюдалось снижение уровня мРНК *PKP2* в биоптатах десен при пародонтите по сравнению с образцами здоровых индивидов, при этом, по мнению исследователей, уровень белка *PKP2*, по-видимому, имеет решающее значение для поддержания барьерной функции эпителия десны и подвержен деградации цистеиновыми протеазами, продуцируемыми *Porphyromonas gingivalis* [95].

Экспрессия *PTPN11* повышалась в тканях толстой кишки пациентов с язвенным колитом [96], а различия по уровню экспрессии *LAMA4* наблюдали между группами пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, по-разному отвечающими на противовоспалительную терапию препаратами анти-ФНО или антиинтегрином  $\alpha 4\beta 7$  [97].

Вовлеченность генов КМП в функционирование различных систем органов может указывать на возможность системных нарушений при развитии кардиомиопатий. Действительно, продемонстрирована успешность комплексного подхода лечения воспалительной кардиомиопатии, приводящего к купированию симптомов хронической сердечной недостаточности и развития ДКМП, который включал блокаду ренин-ангиотензин-альдостероновой и симпатoadреналовой систем, применение ингибиторов неприлизина и блокаторов поздних натриевых каналов кардиомиоцитов в сочетании с адекватной диуретической, антикоагулянтной/антиагрегантной и антиаритмической терапией [98].

Плейотропные эффекты генов КМП выявлены и при использовании других подходов. Так, Р.К. Chauhan и R. Sowdhamini [7] на основании анализа интерактома и методов сетевой медицины определили ряд молекулярных маркеров, лежащих в основе генетического взаимодействия между КМП и другими заболеваниями. Авторами процитированной работы показано, что гены КМП формируют связь с различными заболеваниями, среди которых преобладали патология мозга, онкозаболевания и метаболические нарушения. Эти данные согласуются с заключениями, которые можно сделать на основании анализа вовлеченности генов КМП в формирование риска развития различных заболеваний и вариативность широкого спектра количественных признаков по данным GWAS, представленных в настоящем сообщении.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в настоящей статье данные свидетельствуют о том, что гены первичных КМП обладают выраженными плейотропными эффектами. Для полиморфных вариантов генов КМП зарегистрированы ассоциации с широким спектром параметров, отражающих функционирование сердечно-сосудистой системы (в том числе у здоровых индивидов), и с патологическими состояниями. В числе таких признаков – различные показатели артериального давления, ЭКГ- и ЭхоКГ-параметры сердца, кардиоспецифичные биохимические маркеры, среди патологий – не только КМП, но и аритмии, пороки сердца и др. Гены КМП в качестве полигенного компонента оказались вовлечены в формирование фенотипических особенностей, значимых для риска развития патологий сердечно-сосудистой системы, включая заболевания и признаки костно-мышечной и нервной систем, эндокринные, биохимические и другие показатели.

Структурно-функциональные особенности различных систем органов и метаболических путей могут определять спектр коморбидных заболеваний, предшествующих, сопутствующих КМП и развивающихся в качестве осложнений при разных типах патологии миокарда. Несмотря на то что в настоящее время не всегда представляется возможным установить этап, на котором формируются различные гено-фенотипические связи (в том числе и причинно-следственные), накапливаются доказательства, что варианты генов первичных КМП могут выступать в качестве независимых факторов риска широкого спектра

заболеваний (в т.ч. заболеваний сердца и сосудов, онкопатологий и инфекционных болезней, метаболических нарушений).

Одной из задач предстоящих исследований является решение вопроса о причинно-следственных отношениях коморбидных патологий, в том числе различных типов КМП, с помощью подхода менделевской рандомизации, данных GWAS и секвенирования геномов. Важным аспектом является проведение функциональных работ для определения биологической значимости выявленных ассоциаций вариантов генов КМП с заболеваниями различных систем и органов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования № 122020300041-7.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M. et al. ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
2. Ding W.W., Wang B.Z., Han L. et al. [ALPK3 gene-related pediatric cardiomyopathy with craniofacial-skeletal features: a report and literature review] [Article in Chinese] // *Zhonghua Er Ke Za Zhi = Chinese J. Pediatrics.* 2021. V. 59. № 9. P. 787–792. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112140-20210222-00150>
3. McKenna W.J., Judge D.P. Epidemiology of the inherited cardiomyopathies // *Nat. Rev. Cardiol.* 2021. V. 18. № 1. P. 22–36. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0428-2>
4. Кучер А.Н., Валиахметов Н.Р., Салахов Р.Р. и др. Фенотипическая вариативность гипертрофической кардиомиопатии у носителей патогенного варианта p.Arg870His гена MYH7 // *Бюлл. Сиб. медицины.* 2022. Т. 21. № 3. С. 205–216. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-3-205-216>
5. Salakhov R.R., Golubenko M.V., Valiakhmetov N.R. et al. Application of long-read nanopore sequencing to the search for mutations in hypertrophic

- cardiomyopathy // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 24. <https://doi.org/10.3390/ijms232415845>
6. *Безнанишвили Т.Г., Гудкова А.Я., Давыдова В.Г. и др.* Факторы кардиометаболического риска и их связь с полиморфным вариантом rs2228145 гена рецептора интерлейкина-6 у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // *Росс. кардиол. журн.* 2020. Т. 25. № 10. С. 4098. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4098>
  7. *Chauhan P.K., Sowdhamini R.* Integrative network analysis interweaves the missing links in cardiomyopathy diseaseome // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 19670. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24246-x>
  8. *Jex N., Chowdhary A., Thirunavukarasu S. et al.* Coexistent diabetes is associated with the presence of adverse phenotypic features in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Diabetes Care.* 2022. V. 45. № 8. P. 1852–1862. <https://doi.org/10.2337/dc22-0083>
  9. *Lee H.J., Kim H.K., Kim B.S. et al.* Impact of diabetes mellitus on the outcomes of subjects with hypertrophic cardiomyopathy: A nationwide cohort study // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2022. V. 186. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109838>
  10. *Robertson J., Lindgren M., Schaufelberger M. et al.* Body mass index in young women and risk of cardiomyopathy: A long-term follow-up study in Sweden // *Circulation.* 2020. V. 144. № 7. P. 520–529. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044056>
  11. *Карпуть И.А., Снежицкий В.А., Курбат М.Н. и др.* Роль полиморфизмов генов TTN, TTN-truncation, MMP-2, MMP-3 в развитии антрациклин-индуцированной кардиомиопатии // *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та.* 2021. Т. 19. № 2. С. 135–140. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-2-5-135-140>
  12. *Макаров И.А., Бородин К.О., Макарова Т.А., Митрофанова Л.Б.* Изменение фенотипа кардиомиопатии на фоне миокардита // *MEDLINE.RU. Росс. биомед. журн.* 2022. Т. 23. № 1. С. 298–311
  13. *Povysil G., Chazara O., Carss K.J. et al.* Assessing the role of rare genetic variation in patients with heart failure // *JAMA Cardiol.* 2021. V. 6. № 4. P. 379–386. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.6500>
  14. *Patel A.P., Dron J.S., Wang M. et al.* Association of pathogenic DNA variants predisposing to cardiomyopathy with cardiovascular disease outcomes and all-cause mortality // *JAMA Cardiol.* 2022. V. 7. № 7. P. 723–732. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2022.0901>
  15. *Tiron C., Campuzano O., Fernández-Falgueras A. et al.* Prevalence of pathogenic variants in cardiomyopathy-associated genes in myocarditis // *Circ. Genom. Precis. Med.* 2022. V. 15. № 3. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.121.003408>
  16. *Walsh R., Offerhaus J.A., Tadros R., Bezzina C.R.* Minor hypertrophic cardiomyopathy genes, major insights into the genetics of cardiomyopathies // *Nat. Rev. Cardiol.* 2022. V. 19. № 3. P. 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00608-2>
  17. *Di Lorenzo F., Marchionni E., Ferradini V. et al.* DSP-related cardiomyopathy as a distinct clinical entity? Emerging evidence from an Italian cohort // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 3. <https://doi.org/10.3390/ijms24032490>
  18. *Parker L.E., Kramer R.J., Kaplan S., Landstrom A.P.* One gene, two modes of inheritance, four diseases: A systematic review of the cardiac manifestation of pathogenic variants in JPH2-encoded junctophilin-2 // *Trends Cardiovasc. Med.* 2023. V. 33. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2021.11.006>
  19. *Sollis E., Mosaku A., Abid A. et al.* The NHGRI-EBI GWAS Catalog: knowledgebase and deposition resource // *Nucl. Acids Res.* 2022. V. 51. № D1. P. D977–D985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1010>
  20. *Hamosh A., Scott A.F., Amberger J.S. et al.* Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), A knowledgebase of human genes and genetic disorders // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33 (Database Issue). P. D514–D517. <https://doi.org/10.1093/nar/gki033>
  21. *Szklarczyk D., Franceschini A., Wyder S. et al.* STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43 (Database Issue). P. D447–D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
  22. *McMurry J.A., Köhler S., Washington N.L. et al.* Navigating the phenotype frontier: The Monarch Initiative // *Genetics.* 2016. V. 203. № 4. P. 1491–1495. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.188870>
  23. *Shefchek K.A., Harris N.L., Gargano M. et al.* The Monarch Initiative in 2019: An integrative data and analytic platform connecting phenotypes to genotypes across species // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № D1. P. D704–D715. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz997>
  24. *Zhou Y., Zhou B., Pache L. et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1523. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>
  25. *Watanabe K., Taskesen E., van Bochoven A., Posthuma D.* Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 1826. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01261-5>
  26. *Kim C.Y., Baek S., Cha J. et al.* HumanNet v3: An improved database of human gene networks for disease research // *Nucl. Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D632–D639. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1048>

27. GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 6. P. 580–585. <https://doi.org/10.1038/ng.2653>
28. Han P., Li W., Yang J. et al. Epigenetic response to environmental stress: Assembly of BRG1-G9a/GLP-DNMT3 repressive chromatin complex on Myh6 promoter in pathologically stressed hearts // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1863. № 7 Pt B. P. 1772–1781. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.002>
29. Forini F., Nicolini G., Kusmic C. et al. T3 critically affects the Mhrt/Brg1 axis to regulate the cardiac MHC switch: role of an epigenetic cross-talk // *Cells.* 2020. V. 9. № 10. <https://doi.org/10.3390/cells9102155>
30. Li X., Lin G., Liu T. et al. Postnatal development of BAG3 expression in mouse cerebral cortex and hippocampus // *Brain Struct. Funct.* 2021. V. 226. № 8. P. 2629–2650. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02356-y>
31. UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № D1. P. D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
32. Jomova K., Makova M., Alomar S.Y. et al. Essential metals in health and disease // *Chem. Biol. Interact.* 2022. V. 367. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110173>
33. Zhang Y., He J., Jin J., Ren C. Recent advances in the application of metallomics in diagnosis and prognosis of human cancer // *Metallomics.* 2022. V. 14. № 7. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac037>
34. Zhang Y., Huang B., Jin J. et al. Recent advances in the application of ionomics in metabolic diseases // *Front. Nutr.* 2023. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1111933>
35. Brownrigg J.R., Leo V., Rose J. et al. Epidemiology of cardiomyopathies and incident heart failure in a population-based cohort study // *Heart.* 2022. V. 108. № 17. P. 1383–1391. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2021-320181>
36. Surget E., Maltret A., Raimondi F. et al. Clinical presentation and heart failure in children with arrhythmogenic cardiomyopathy // *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2022. V. 15. № 2. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.121.010346>
37. Buckley B.J.R., Harrison S.L., Gupta D. et al. Atrial fibrillation in patients with cardiomyopathy: Prevalence and clinical outcomes from real-world data // *J. Am. Heart Assoc.* 2021. V. 10. № 23. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.021970>
38. Cipriani A., Perazzolo Marra M., Bariani R. et al. Differential diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: Phenocopies versus disease variants // *Minerva Med.* 2021. V. 112. № 2. P. 269–280. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.20.06782-8>
39. Yoneda Z.T., Anderson K.C., Quintana J.A. et al. Early-onset atrial fibrillation and the prevalence of rare variants in cardiomyopathy and arrhythmia genes // *JAMA Cardiol.* 2021. V. 6. № 12. P. 1371–1379. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.3370>
40. Shah R.A., Asatryan B., Sharaf Dabbagh G. et al. Frequency, Penetrance, and variable expressivity of dilated cardiomyopathy-associated putative pathogenic gene variants in UK Biobank Participants // *Circulation.* 2022. V. 146. № 2. P. 110–124. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058143>
41. Osteraas N.D., Lee V.H. Chapter 4 – Neurocardiology // *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier, 2017. P. 49–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63600-3.00004-0>
42. Gopinath R., Ayya S.S. Neurogenic stress cardiomyopathy: What do we need to know // *Ann. Card. Anaesth.* 2018. V. 21. № 3. P. 228–234. [https://doi.org/10.4103/aca.ACA\\_176\\_17](https://doi.org/10.4103/aca.ACA_176_17)
43. Ripoll J.G., Blackshear J.L., Díaz-Gómez J.L. Acute cardiac complications in critical brain disease // *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2018. V. 29. № 2. P. 281–297. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2017.11.007>
44. Ganassi M., Zammit P.S. Involvement of muscle satellite cell dysfunction in neuromuscular disorders: Expanding the portfolio of satellite cellopathies // *Eur. J. Transl. Myol.* 2022. V. 32. № 1. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2022.10064>
45. Shi K., Huang S., Li X. et al. Effect of obesity on left ventricular remodeling and clinical outcome in chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy: Assessed by cardiac MRI // *J. Magn. Reson. Imaging.* 2023. V. 57. № 3. P. 800–809. <https://doi.org/10.1002/jmri.28306>
46. Nollet E.E., Westenbrink B.D., de Boer R.A. et al. Unraveling the genotype–phenotype relationship in hypertrophic cardiomyopathy: Obesity-related cardiac defects as a major disease modifier // *J. Am. Heart. Assoc.* 2020. V. 9. № 22. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018641>
47. Chen B., Tang W.H.W., Rodriguez M. et al. NAFLD in cardiovascular diseases: A contributor or comorbidity? // *Semin. Liver Dis.* 2022. V. 42. № 4. P. 465–474. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1757712>
48. Chang W.H., Mueller S.H., Chung S.C. et al. Increased burden of cardiovascular disease in people with liver disease: Unequal geographical variations, risk factors and excess years of life lost // *J. Transl. Med.* 2022. V. 20. № 1. P. 2. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03210-9>
49. Liu S., Yan Z., Liu Q. The Burden of psoriasis in China and global level from 1990 to 2019: A systematic analysis from the global burden of disease study 2019 // *Biomed. Res. Int.* 2022. V. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3461765>

50. Gupta A., Madke B. Psoriasis a cause of cardiovascular diseases: A review article // *Cureus*. 2022. V. 14. № 8. <https://doi.org/10.7759/cureus.27767>
51. Filardi T., Ghinassi B., Di Baldassarre A. et al. Cardiomyopathy associated with diabetes: The central role of the cardiomyocyte // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 13. P. 3299. <https://doi.org/10.3390/ijms20133299>
52. Sanganalmath S.K., Dubey S., Veeranki S. et al. The interplay of inflammation, exosomes and Ca<sup>2+</sup> dynamics in diabetic cardiomyopathy // *Cardiovasc. Diabetol.* 2023. V. 22. № 1. P. 37. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01755-1>
53. Zaffran S., Kraoua L., Jaouadi H. Calcium handling in inherited cardiac diseases: A focus on catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and hypertrophic cardiomyopathy // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 4. <https://doi.org/10.3390/ijms24043365>
54. Волков В. К вопросу о сроке развития нейрорегулируемой кардиомиопатии // *Врач.* 2019. Т. 30. № 9. С. 31–34. <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-09-05>
55. Osterlund P., Kinos S., Pfeiffer P. et al. Continuation of fluoropyrimidine treatment with S-1 after cardiotoxicity on capecitabine- or 5-fluorouracil-based therapy in patients with solid tumours: A multicentre retrospective observational cohort study // *ESMO Open*. 2022. V. 7. № 3. P. 100427. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100427>
56. Thomas S.D., Jha N.K., Jha S.K. et al. Pharmacological and molecular insight on the cardioprotective role of apigenin // *Nutrients*. 2023. V. 15. № 2. P. 385. <https://doi.org/10.3390/nu15020385>
57. Li M.Y., Peng L.M., Chen X.P. Pharmacogenomics in drug-induced cardiotoxicity: Current status and the future // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.966261>
58. Harding D., Chong M.H.A., Lahoti N. et al. Dilated cardiomyopathy and chronic cardiac inflammation: Pathogenesis, diagnosis and therapy // *J. Intern. Med.* 2023. V. 293. № 1. P. 23–47. <https://doi.org/10.1111/joim.13556>
59. Poller W., Kühl U., Tschöpe C. et al. Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2005. V. 83. № 8. P. 579–586. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0664-2>
60. Kažukauskienė I., Baltrūnienė V., Jakubauskas A. et al. Prevalence and prognostic relevance of myocardial inflammation and cardiotropic viruses in non-ischemic dilated cardiomyopathy // *Cardiol. J.* 2022. V. 29. № 3. P. 441–453. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2020.0088>
61. Welty F.K., Rajai N., Amangurbanova M. Comprehensive review of cardiovascular complications of coronavirus disease 2019 and beneficial treatments // *Cardiol. Rev.* 2022. V. 30. № 3. P. 145–157. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000422>
62. Akhtar Z., Trent M., Moa A. et al. The impact of COVID-19 and COVID vaccination on cardiovascular outcomes // *Eur. Heart J. Suppl.* 2023. V. 25. № Suppl. A. P. A42–A49. <https://doi.org/10.1093/eurheartjsupp/suac123>
63. Goyal M., Ray I., Mascarenhas D. et al. Myocarditis post-SARS-CoV-2 vaccination: A systematic review // *QJM: An Intern. J. Medicine*. 2023. V. 116. № 1. P. 7–25. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcac064>
64. Hammersley D.J., Buchan R.J., Lota A.S. et al. Direct and indirect effect of the COVID-19 pandemic on patients with cardiomyopathy // *Open Heart*. 2022. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2021-001918>
65. Hill E., Mehta H., Sharma S. et al. Risk factors associated with post-acute sequelae of SARS-CoV-2 in an EHR cohort: A National COVID Cohort Collaborative (N3C) analysis as part of the NIH RECOVER program [Preprint] // *medRxiv*. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.08.15.22278603>
66. Lu J.F., Fan Z.X., Li Y. et al. Risk factors, clinical features, and outcomes of patients with hypertrophic cardiomyopathy complicated by ischemic stroke: A single-center retrospective study // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1054199>
67. Gyftopoulos A., Chen Y.J., Wang L. et al. Identification of Novel Genetic Variants and Comorbidities Associated With ICD-10-based diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy using the UK Biobank Cohort // *Front. Genet.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.866042>
68. Pogran E., Abd El-Razek A., Gargiulo L. et al. Long-term outcome in patients with takotsubo syndrome: A single center study from Vienna // *Wien Klin. Wochenschr.* 2022. V. 134. № 7–8. P. 261–268. <https://doi.org/10.1007/s00508-021-01925-9>
69. Palasca O., Santos A., Stolte C. et al. TISSUES 2.0: An integrative web resource on mammalian tissue expression // *Database (Oxford)*. 2018. V. 2018. № 7. <https://doi.org/10.1093/database/bay003>
70. Zheng Q.X., Wang J., Gu X.Y. et al. TTN-AS1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for multiple cancers // *Biomed. Pharmacother.* 2012. V. 135. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111169>
71. Biswas A., Nath S.D., Ahsan T. et al. TTN as a candidate gene for distal arthrogryposis type 10 pathogenesis // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2022. V. 20. № 1. P. 119. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00405-5>
72. Rai B., Naylor P., Sanchez M.S. et al. Novel effects of Ras-MAPK pathogenic variants on the developing human brain and their link to gene expression and inhibition abilities [Preprint] // *Res. Sq.* 2023.

- <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2580911/v1>
73. Gao J., Liu H., Wang X. et al. Associative analysis of multi-omics data indicates that acetylation modification is widely involved in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease // *Front. Med. (Lausanne)*. 2023. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1030644>
  74. Chen J., Wen Y., Su H. et al. Deciphering prognostic value of TTN and its correlation with immune infiltration in lung adenocarcinoma // *Front. Oncol.* 2022. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.877878>
  75. Xie S., Wang X. CRYAB reduces cigarette smoke-induced inflammation, apoptosis, and oxidative stress by retarding PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways in human bronchial epithelial cells // *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*. 2022. V. 50. № 5. P. 23–29. <https://doi.org/10.15586/aei.v50i5.645>
  76. Becerra-Hernández L.V., Escobar-Betancourt M.I., Pimienta-Jiménez H.J., Buriticá E. Crystallin alpha-B overexpression as a possible marker of reactive astrogliosis in human cerebral contusions // *Front. Cell Neurosci.* 2022. V. 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.838551>
  77. Parnell L.D., Magadmi R., Zwanger S. et al. Dietary responses of dementia-related genes encoding metabolic enzymes // *Nutrients*. 2023. V. 15. № 3. <https://doi.org/10.3390/nu15030644>
  78. Yao L., Lin K., Zheng Z. et al. Bioinformatic analysis of genetic factors from human blood samples and postmortem brains in Parkinson's disease // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9235358>
  79. Liang L., Yan J., Huang X. et al. Identification of molecular signatures associated with sleep disorder and Alzheimer's disease // *Front. Psychiatry*. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.925012>
  80. Rahman M.R., Islam T., Zaman T. et al. Identification of molecular signatures and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: Insights from a systems biomedicine perspective // *Genomics*. 2020. V. 112. № 2. P. 1290–1299. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.018>
  81. Giannos P., Prokopidis K., Raleigh S.M. et al. Altered mitochondrial microenvironment at the spotlight of musculoskeletal aging and Alzheimer's disease // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 11290. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15578-9>
  82. Zheng H., Qian X., Tian W., Cao L. Exploration of the common gene characteristics and molecular mechanism of Parkinson's disease and Crohn's disease from transcriptome data // *Brain Sci.* 2022. V. 12. № 6. P. 774. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060774>
  83. Chen S., Chen L., Jiang H. Integrated bioinformatics and clinical correlation analysis of key genes, pathways, and potential therapeutic agents related to diabetic nephropathy // *Dis. Markers*. 2022. V. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9204201>
  84. Diao M., Wu Y., Yang J. et al. Identification of novel key molecular signatures in the pathogenesis of experimental diabetic kidney disease // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.843721>
  85. Wu C., Tan S., Liu L. et al. Transcriptome-wide association study identifies susceptibility genes for rheumatoid arthritis // *Arthritis Res. Ther.* 2022. V. 23. P. 38. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02419-9>
  86. Carruthers N.J., Strieder-Barboza C., Caruso J.A. et al. The human type 2 diabetes-specific visceral adipose tissue proteome and transcriptome in obesity // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 17394. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96995-0>
  87. Gou W., Wei H., Swaby L. et al. Deletion of spinophilin promotes white adipocyte browning // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023. V. 16. № 1. P. 91. <https://doi.org/10.3390/ph16010091>
  88. Xiao M., Zhang Y., Xu X. Calorie restriction combined with high-intensity interval training promotes browning of white adipose tissue by activating the PPAR $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$ /UCP1 pathway // *Altern. Ther. Health Med.* 2023. V. 29. № 3. P. 134–139.
  89. Zhang Y., Qi J., Zhao J. et al. Effect of dietetic obesity on testicular transcriptome in Cynomolgus Monkeys // *Genes (Basel)*. 2023. V. 14. № 3. <https://doi.org/10.3390/genes14030557>
  90. Mishra B.K., Madhu S.V., Aslam M. et al. Adipose tissue expression of UCP1 and PRDM16 genes and their association with postprandial triglyceride metabolism and glucose intolerance // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2021. V. 182. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109115>
  91. Li X., Lu Y., Zhang L., Song A. et al. Primary and secondary hyperparathyroidism present different expressions of calcium-sensing receptor // *BMC Surg.* 2023. V. 23. № 1. P. 31. <https://doi.org/10.1186/s12893-023-01928-5>
  92. Li R., Zhang J., Wang Q. et al. TPM1 mediates inflammation downstream of TREM2 via the PKA/CREB signaling pathway // *J. Neuroinflammation*. 2022. V. 19. № 1. P. 257. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02619-3>
  93. He X., Wang T., Ran N. et al. MicroRNA-21-5p regulates CD3+T lymphocytes through VCL and LTF in patients with immune thrombocytopenia // *Clin. Lab.* 2022. V. 68. № 7. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210907>
  94. Wang R., Xiao Y., Pan M. et al. Integrative analysis of bulk RNA-Seq and Single-Cell RNA-Seq unveils the characteristics of the immune microenvironment and prognosis signature in prostate cancer // *J. Oncol.* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6768139>

95. Yu N., Zhang J., Phillips S.T. et al. Impaired function of epithelial plakophilin-2 is associated with periodontal disease // *J. Periodontol. Res.* 2021. V. 56. № 6. P. 1046–1057. <https://doi.org/10.1111/jre.12918>
96. Wang M., Li J., Yin Y. et al. Network pharmacology and in vivo experiment-based strategy to investigate mechanisms of JingFangFuZiLiZhong formula for ulcerative colitis // *Ann. Med.* 2022. V. 54. № 1. P. 3219–3233. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2095665>
97. Iacucci M., Jeffery L., Acharjee A. et al. Computer-aided imaging analysis of probe-based confocal laser endomicroscopy with molecular labeling and gene expression identifies markers of response to biological therapy in IBD patients: The Endo-Omics Study // *Inflamm. Bowel Dis.* 2022. <https://doi.org/10.1093/ibd/izac233>
98. Цыгвинцев А.А., Лищук А.А., Сторожкилов В.А., Иванов Д.В. (2019) Обратимая дилатация полостей сердца как маркер новых возможностей в терапии воспалительной и дилатационной кардиомиопатии // *Вестник новых мед. технологий.* 2019.Т. 26. № 4. С. 29–34. <https://doi.org/10.24411/1609-2163-2019-16526>

## The Scope of Mendelian Cardiomyopathies Genes

A. N. Kucher<sup>1</sup>, M. S. Nazarenko<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Research Institute of Medical Genetics, Federal State Budgetary Scientific Institution “Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences”, Tomsk 63405 Russian Federation*

\*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

**Abstract.** The review is devoted to the analysis of the scope of the genes of Mendelian cardiomyopathies (CM), specifically hypertrophic, dilatational, arrhythmogenic, and restrictive cardiomyopathy. According to Simple ClinVar, pathogenic/probably pathogenic variants of 75 genes lead to the development of one or more types of CM. At the same time, these genes are characterized by their expression in various tissues and organs (not only in the heart and blood vessels, but also in various parts of the brain, gastrointestinal tract, etc.), as well as by their involvement in a variety of metabolic pathways and biological processes. These data are generally consistent with the results of genome-wide association studies (GWAS). Polymorphisms of the CM genes are associated with various types of CM and other cardiovascular diseases, as well as obesity, various diseases of the musculoskeletal and nervous systems, mental, oncological, infectious diseases, and others. In addition to pathological conditions, common variants of the CM genes contributed to the variability of a wide range of quantitative traits, including pathogenetically significant for various multifactorial diseases. The non-randomness of the identified associations of CM genes with a wide range of diseases is evidenced by: comorbidity of CM with GWAS-associated diseases or the involvement of the latter as a symptom, a risk factor for the development of myocardial pathology, a modifier of the clinical presentation; overlapping of the affected organ systems and the spectrum of pathologies associated with common variants (according to GWAS) and to which rare pathogenic variants (according to OMIM) of the CM genes lead; confirmation of the involvement of CM genes in the pathogenesis of pathologies of other organ systems at the molecular level. Thus, the data presented in the review indicate the wide scope of the genes of primary CM, which goes beyond the cardiovascular system. That indicates the relevance of conducting comprehensive studies aimed at determining the cause-and-effect relationships between the CM and pathologies of other organs, including with the involvement of molecular genetic data.

**Keywords:** genes of Mendelian cardiomyopathies, pleiotropic effects of cardiomyopathies genes, genome-wide association studies, comorbidity of cardiomyopathies and multifactorial diseases.

УДК 632.95.02:575.2:577.3:579.842.11

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОМА *Escherichia coli* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

М. Ю. Галлямова<sup>1</sup>, К. Н. Вагин<sup>1, 2, \*</sup>, Н. М. Василевский<sup>1</sup>, Н. И. Хаммадов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, 420075 Россия

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: kostya9938@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 22.08.2023 г.

Исследование изменений генетического аппарата биологических систем вследствие воздействия физических факторов способствует пониманию механизмов адаптации. Статья посвящена анализу генома модифицированного варианта *Escherichia coli* ПЛ-6, полученного в результате неоднократного и постепенно возрастающего воздействия гамма-лучей <sup>60</sup>Co на установке “Исследователь”. Целостность генетического материала исследуемых бактериальных клеток проверяли методом электрофореза в 1.7%-ном агарозном геле. Для анализа модификаций генома был произведен дизайн праймеров для амплификации нескольких локусов, характеризующихся гомологией у множества штаммов *E. coli*. Исходя из показателей количества и размера амплифицированных продуктов с применением каждого из представленных праймерных комбинаций у кишечной палочки до и после гамма-облучения, установлено значительное изменение генома.

**Ключевые слова:** геном, ионизирующее облучение, *Escherichia coli* ПЛ-6, повреждение ДНК, полимеразная цепная реакция.

**DOI:** 10.31857/S0016675824010041

Ионизирующее излучение, как стресс-фактор физической природы, способно воздействовать на живые клетки прямым (прямое энергетическое действие) и косвенным образом (через образование свободных радикалов) [1–6]. Результатом физико-химического взаимодействия между ионизирующим излучением и ДНК являются одно- и двунитевые разрывы, апуриновые и апириимидиновые сайты, модификации оснований, сшивки ДНК и белков [7, 8].

Степень радиочувствительности биологических объектов можно оценивать, используя различные критерии [9–11]. Критерий выживаемости является основным, при котором характеристикой радиочувствительности служит величина летальной дозы. Принцип действия радиации на биологические объекты объясняется взаимодействием излучения различных видов и энергии с молекулярными структурами, способным привести к повреждениям, способствующим либо возникновению изменений функций процессов, происходящих внутри клетки, либо гибели организма.

Радиочувствительность живых организмов в большей степени зависит от размера генома

[12, 13], от эффективной работы систем репарации повреждений нуклеиновых кислот и от размера мишени [14, 15], что свидетельствует о том, что более крупные геномы обычно характеризуются сниженной устойчивостью к действию ионизирующей радиации: увеличение размера генома в 10 раз примерно двукратно снижает радиоустойчивость организма. Но основную роль играет не только изначальная радиочувствительность организма, также большое значение оказывает интегральный функциональный резерв, благодаря которому существует возможность быстро и эффективно восстановить клеточные системы после действия излучения. Микроорганизмы обладают значительной устойчивостью к действию ионизирующего излучения [16, 17]. Данное явление основано на высокой степени эффективности системы репарации и реверсии биоповреждений, приобретенной в процессе эволюции в среде обитания с агрессивными факторами (наличие токсических веществ, экстремальные температуры, резкие смены pH, разного рода излучения и т.д.) [18].

Генотипическая изменчивость формируется по причине генетических рекомбинаций и мутаций [19–21]. В ходе эксперимента в качестве

мутагена было выбрано направленное влияние гамма-лучей  $^{60}\text{Co}$ , что позволило нам получить радиоустойчивую *Escherichia coli* ПЛ-6 (R), отличающуюся от *E. coli* ПЛ-6 по фенотипическим признакам (морфологические, биохимические, культуральные) и имеющую изменения в геноме по сравнению с контрольной *E. coli* ПЛ-6 [22–24].

Цель исследования – сравнение и анализ изменчивости генетического материала производственного штамма *Escherichia coli* ПЛ-6 (в виде контрольного варианта без каких-либо воздействий) и радиомодифицированного варианта *E. coli* ПЛ-6 (R) (пятый пересев после облучения).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе проведения эксперимента использовался производственный штамм *Escherichia coli* (штамм ПЛ-6, № 1154115 эшерихиозной диареи поросят), полученный из коллекции музея штаммов ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ.

Путем облучения *E. coli* ПЛ-6 последовательно увеличивающимися дозами ионизирующего излучения получен радиорезистентный вариант *E. coli* ПЛ-6 (R), отличающийся от исходного морфологическими (удлинение клеток до 5 раз) и биохимическими (высокая каталазная, пероксидазная и супероксиддисмутазная активности, способность синтеза цистеина и увеличение содержания ДНК) свойствами, обладающий повышенной степенью устойчивости к действию ионизирующей радиации. С целью получения радиорезистентного *E. coli* ПЛ-6 (R) микробные клетки облучали на гамма-установке “Исследователь”, изготовленной на заводе “Балтиец” (г. Нарва), ведомственная принадлежность гамма-установки “Исследователь” – Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, с мощностью экспозиционной дозы 3.11 кГр/ч в диапазоне доз от 2 до 30 кГр.

Для получения продуктов метаболизма *E. coli* ПЛ-6, микроорганизм культивировали на жидких питательных средах (в мясоептонном бульоне) в соответствии с общепринятой в микробиологической практике методикой, получая по три фракции. При этом плотность культур в стационарной фазе роста (24 ч) составляла  $2.06 \times 10^9$  микробных клеток на 1 мл (*E. coli* ПЛ-6), содержание сухого вещества в культуральной жидкости –  $69.5 \pm 1.7$  мг/мл.

Клетки микроорганизмов отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 5000 g. Супернатант культуральной жидкости собирали для определения содержания биологически активных веществ. Биомассу суспендировали в дистиллированной воде, после чего вновь центрифугировали в течение 13 мин при 5000 g для отмывания компонентов культуральной жидкости (КЖ).

По данной методике получен очищенный и достаточно плотный осадок микробной биомассы влажностью от 80 до 90%. Биомассу охлаждали до 0°C и далее разрушали ультразвуковой обработкой (22 кГц) в течение 25 мин, после чего отделяли разрушившиеся клетки и фрагменты клеток центрифугированием в течение 15 мин при 1000 g. Полноту разрушения клеток контролировали микроскопическим методом. В полученном супернатанте определяли содержание антиоксидантного фермента пероксидазы.

Активность супероксиддисмутазы определяли по методу Fridovich (1995). В качестве окислительных субстратов использовали нитросиний тетразолий (НСТ) и N-метилфенозоний метилсульфат. За единицу активности принимали 50%-ное торможение реакции восстановления НСТ.

Выделение нуклеиновых кислот проводилось из взвеси бактерий, полученной путем смыва бактериальных клеток стерильным физиологическим раствором с поверхности плотной питательной среды, с использованием набора “РИ-БО-преп” согласно инструкции. Применение данного набора подразумевает выделение ДНК и РНК, последняя при этом (без реакции обратной транскрипции) на амплификацию генетического материала *E. coli* ПЛ-6 влияния не оказывает.

Исследовали метаболизм цистеина у *E. coli* ПЛ-6. Для этой цели пробы сухой биомассы исходного *E. coli* ПЛ-6 и радиорезистентного варианта *E. coli* ПЛ-6-R тест-микроба навеской 100 мг ( $3.18 \times 10^{11}$  м. к./мл) подвергали кислотному гидролизу (6 н раствор HCl 1 : 200) при 105°C в течение 24 ч с последующим хроматографированием определяемой аминокислоты на специальной бумаге (№ 2, сорт 1, “быстрая”, 1992) отечественного производства в соответствии с методическими рекомендациями Т.Н. Зайцевой и Н.Г. Ткачевой (1958). Испытуемые гидролизаты исходного и радиорезистентного вариантов *E. coli* наносили на бумагу

Таблица 1. Праймеры, используемые в работе

Название локуса	Нуклеотидная последовательность прямого праймера	Нуклеотидная последовательность обратного праймера	GenBank ID
1pO26-Vir	aactcttctgttctgattcttctgg	gctattcataactttattccacgatttaac	NC_012487
1pVM01	aactccctcgtcacagcactga	ccctctttacgcttctgctgc	EU330199
1p417H-90	ctcacctctgtctgttctgtgt	gcagttcagaataactgtcctcttacaata	JQ418522
1pNDM102337	tggagaacacaatgcgaagtca	ccttcctgagcattcttccg	NC_019045
1pChi7122-2	ccctgtctgttctgtctgtgg	gcattcttctgacccgattt	NC_019037
3pO26-Vir	atcagcatttaatacagcatcatcaag	ttgtcgttaaagttgtgagtgtgtg	NC_012487
2pNDM102337	gggatttcgagaagatggtcagtat	tagaacctttgatttctatgtgttacc	NC_019045
1pChi7122-3	aatggtcgcaagcagaacg	ttagtgcagtcctgtgaaatcgtc	FR851304
4pO26-Vir	tactctcttaatacagccatattacaggag	ggaaattagcgttgactgcattatc	NC_012487
1pO86A1	cgtcgggttattctacatctgttg	cagtcccaaacgcatattatcctt	AB255435
4pVM01	atcagttattctgtgattttgctgaa	ccgtcagatcgaactcataatgc	EU330199

пипеткой на одно и то же место. Таким же способом наносили раствор смеси аминокислот. Разгонку проводили трехкратно по 6 ч. Расчеты по определению содержания аминокислот проводили по калибровочным кривым для аминокислот по L-аминному азоту.

Для поиска генов *E. coli* была использована база генов NCBI. Были выбраны 11 различных локусов, имеющих у большого разнообразия штаммов и изолятов кишечной палочки размером амплифицируемого фрагмента 2–5 тыс. п. н. (пар нуклеотидов).

Подбор праймеров был выполнен с помощью программы Vector NTI 9.1. Для подбора праймеров критерием служила одинаковая температура отжига, обеспечивающая амплификацию всех праймеров по одной программе. Используемые в исследовании праймеры указаны в табл. 1.

Амплификация выделенной ДНК была проведена при следующих условиях:

– объем реакционной смеси составлял 15 мкл, из них: H<sub>2</sub>O – 4.0, буфер + EvaG – 1.5, MgCl<sub>2</sub> 5 мМ – 1.5, dNTP 2.5 мМ – 1.5, праймер F 10 пкМ – 0.5, праймер R 10 пкМ – 0.5, Tag-полимераза 2.5 ед – 0.5, ДНК – 5 (общие компоненты реакционной смеси произведены компанией ЗАО “Синтол”, Россия);

– температурный режим: горячий старт 95°C – 30 с, 45 циклов – 95°C – 15 с, 48–58°C – 30 с (детектирование продуктов амплификации), 72°C – 10 с.

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации была осуществлена в 1.7%-ном

агарозном геле при напряжении постоянного тока 100 В в течение 50 мин. Окрашивание фрагментов ДНК проводили бромистым этидием.

Применение разработанных праймеров выявило возможность амплификации единичного генетического маркера и множественную ПЦР. Последняя позволяет проводить индикацию изменчивости генома облученных клеток *E. coli* без дополнительной стадии рестрикции наработанного генетического материала. Величину амплифицированных фрагментов ДНК определяли в сравнении с маркером молекулярной массы ДНК (молекулярная масса фрагментов ДНК шагом 100 п. н.) при электрофорезе. Анализ молекулярной массы амплифицированных фрагментов ДНК проводили в программе GelAnalyzer 19.1 (OpenBench, Испания). В результате было выявлено, что действие лучей <sup>60</sup>Co вызвало повреждения в структуре ДНК. Для определения изменчивости генетического материала эшерихий был выполнен ряд пересевов облученной культуры, что способствовало восстановлению структуры ДНК исследуемых бактериальных клеток. При амплификации анализируемых локусов в условиях синтеза нескольких фрагментов в одной реакционной смеси (один маркер) установлено различие в генетическом составе у облученных и необлученных клеток *E. coli*. Такая возможность выявления генетических различий в нуклеотидном составе бактерий до и после облучения определена у 11 амплифицируемых локусов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение активности ферментов антиоксидантной защиты микроорганизма выявило, что как исходная, так и облученные *Escherichia coli*

ПЛ-6 имеют определенную ферментативную активность: в первые 24 ч после посева бактерии разлагают лактозу, глюкозу, сахарозу и маннит, образуя при этом кислоту и газ, не образуют сероводород, не разжижают желатин и не синтезируют цитраты. При культивировании на 5%-ном мясопептонном кровяном агаре было выявлено, что вокруг микробных колоний в процессе роста появлялись зоны просветления, что свидетельствует о способности культуры выделять фермент  $\beta$ -гемолизин.

Для анализа биохимической активности были определены продукты обмена веществ, обладающие, по данным литературы [25], свойством формирования устойчивости организма при лучевом поражении, такие как группа антиокислительных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза), цистеин и ДНК. Биохимическая активность была определена у контрольного и подвергнутого воздействию гамма-лучей <sup>60</sup>Со варианта *E. coli* ПЛ-6 (культура, облученная в дозе 30 кГр). Полученные результаты представлены в табл. 2.

**Таблица 2.** Содержание ДНК, цистеина, каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД) в культуральной жидкости *E. coli* ПЛ-6 и ее радиомодифицированного варианта

Показатель	Единица измерения	Контрольная культура <i>E. coli</i> ПЛ-6	Радиомодифицированная культура <i>E. coli</i> ПЛ-6 (R)
Каталаза	мкат/мл	856.0 ± 12.3	3951.0 ± 21.5*
СОД	мг/белка	483.2 ± 0.32*	1.55 ± 0.27*
Пероксидаза	мкМ/г	0.705 ± 0.03	3.719 ± 0.85*
Цистеин	мкг/мл	1.173 ± 0.03	2.395 ± 0.01*
ДНК	мкг/109мл	0.302 ± 0.05	7.45 ± 0.29*

Примечание. \* –  $p \leq 0.05$ .

Результаты биохимических исследований показали, что приобретенное в результате воздействия гамма-лучей на *E. coli* в возрастающих дозах изменение стимулирует у тест-микроба развитие радиорезистентности с изменением клеточного метаболизма, что сопровождается усилением синтеза нуклеиновых кислот (ДНК) и ферментов антиоксидантной защиты, а именно каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутаза, а также усилением синтеза серосодержащей аминокислоты цистеина из ее предшественников – серина и глицина.

Таким образом, в результате радиомикробиологических исследований получен радиорези-

стентный (радиомодифицированный) вариант *E. coli* (R), отличающийся от исходного штамма *E. coli* ПЛ-6 биохимическими характеристиками (увеличение синтеза ДНК, усиленная активизация ключевых ферментов антирадикальной защиты: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, а также серосодержащей аминокислоты цистеин обладающих радиопротекторными свойствами).

Усиление синтеза нуклеиновых кислот под воздействием гамма-лучей, как видно из вышеприведенных данных, может свидетельствовать о том, что повышение радиорезистентности тест-штамма *E. coli* в процессе радиомутации может осуществляться за счет изменения синтеза тиоловых (сульфгидрильных) групп белков, особенно важнейшей аминокислоты цистеина, синтез и взаимопревращение которого находится под контролем генетического аппарата клеток – РНК, ДНК. Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что в процессе роста на питательной среде исследуемый микроорганизм выделяет ценные метаболиты. При облучении культуры последовательно возрастающими дозами гамма-квантов повышается ее устойчивость, при которой происходит изменение метаболизма бактериальных клеток, что приводит к увеличению синтеза антиоксидантных ферментов.

Для изучения возможных изменений генома предварительно перед амплификацией ДНК проводили контрольный электрофорез для выявления фрагментов ДНК с низкой молекулярной массой (100–5000 п. н.). Контрольный образец характеризовался отсутствием визуально видимых фрагментов ДНК различной молекулярной массы. Результат электрофореза радиомодифицированного восстановленного образца был идентичен контрольному образцу.

Разработанные праймерные комбинации подвергали амплификации в различных температурных режимах отжига олигонуклеотидных затравок. В результате чего установлено, что во время амплификации при температуре отжига индивидуальной для каждой комбинации праймеров образуется множество продуктов ПЦР. Данное обстоятельство позволило произвести анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов. Результат электрофоретического разделения продуктов амплификации в режиме температурного градиента представлен в табл. 3. Исходя из резуль-

**Таблица 3.** Количество продуктов амплификации при различных температурных режимах отжига праймеров с ДНК необлученной бактериальной культуры

Название локуса	Температура отжига					GenBank ID
	48°C	50°C	54°C	57°C	58°C	
1pO26-Vir	—	9*	3	—	—	NC_012487
1pVM01	10*	5	—	1	—	EU330199
1p417H-90	3	3*	—	—	—	JQ418522
1pNDM102337	1	2	—	3*	—	NC_019045
1pChi7122-2	3	3	3	8*	—	NC_019037
3pO26-Vir	2	2*	—	—	1	NC_012487
2pNDM102337	—	3*	—	—	—	NC_019045
1pChi7122-3	—	1	1	4*	—	FR851304
4pO26-Vir	—	1*	—	—	—	NC_012487
1pO86A1	—	—	—	3*	—	AB255435
4pVM01	—	3*	—	—	—	EU330199

Примечание. \* – температура отжига праймеров, используемая в дальнейшей работе.

татов электрофореза были подобраны режимы, характеризующиеся накоплением множества ярких и дискретных полос, позволяющих провести анализ генетических различий (в случае наличия таковых) у облученных и необлученных микробных культур.

Амплификация облученной и исходной ДНК характеризовалась формированием паттернов, молекулярная масса которых в обеих пробах имела значительные различия. Такая картина была установлена во всех 11 амплифицируемых локусах. На представленных рис. 1, 2 четко видны различия молекулярных масс ампликонов контрольных и облученных эшерихий. Для выявления количества амплифицированных фрагментов и их размеров был проведен анализ результатов электрофореза в программе GelAnalyzer 19.1. Числовые данные представлены в табл. 4. Исходя из показателей количества и размера амплифицированных продуктов с применением каждого из представленных праймер-

ных комбинаций у кишечной палочки до и после гамма-облучения установлено значительное изменение генома.

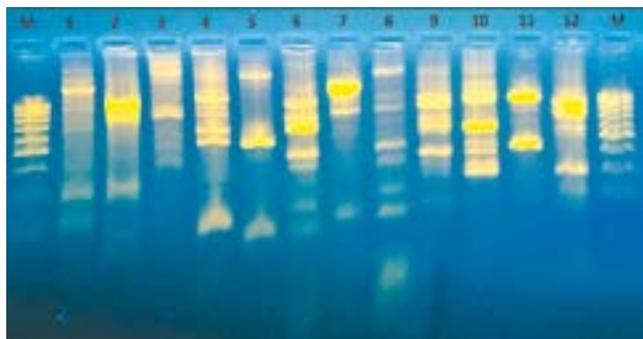
## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате радиомикробиологических исследований получен радиорезистентный (радио-модифицированный) вариант *E. coli* ПЛ-6 (R), отличающийся от исходного штамма *E. coli* ПЛ-6 биохимическими свойствами, усилением синтеза нуклеиновых кислот (ДНК) и ферментов антиоксидантной защиты, а именно каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы, а также усилением синтеза серосодержащей аминокислоты цистеин из ее предшественников – серина и глицина.

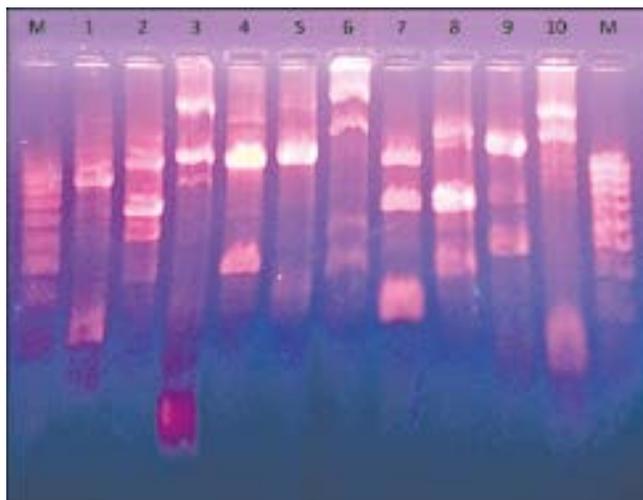
Перестройка генома *E. coli* ПЛ-6 (R) после восстановления повреждений, полученных в результате воздействия гамма-лучей <sup>60</sup>Co, заключалась в изменениях сайтов гибридизации прайме-

**Таблица 4.** Молекулярные массы ампликонов

Название локуса	Культура <i>E. coli</i> до облучения	Культура <i>E. coli</i> после облучения
1pO26-Vir	1836, 1586, 1312, 1121, 991, 807, 736, 298, 228	1014, 845, 316
1pVM01	2079, 1759, 1594, 1356, 1205, 938, 879, 661, 570, 462	1736, 1605, 1090, 983, 884, 675, 579, 224
1p417H-90	1638, 557, 204	1992, 1292, 972, 784, 660, 476, 408, 252, 207
1pNDM102337	1261, 878, 237	1776, 1140, 929, 536, 435, 302, 239, 150
1pChi7122-2	1763, 1021, 942, 768, 690, 651, 482, 270	1366, 1056, 680, 544, 481, 398, 372
3pO26-Vir	997, 517	963, 832, 665, 378, 305
2pNDM102337	1013, 930, 293	1043, 735, 583
1pChi7122-3	1817, 1102, 931, 227	1627, 1099, 482
4pO26-Vir	1122	1817, 1550, 650, 481
1pO86A1	1053, 809, 349	1380, 1262, 790, 472
4pVM01	1224, 827, 523	1740, 1334, 983, 933, 896, 253



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации локусов 1pO26-Vir, 1pVM01, 1p417H-90, 1pNDM102337, 1pChi7122-2 и 3pO26-Vir. М – маркер молекулярной массы ДНК “М16” (Сибэнзим, Россия); 1, 2 – локус 1pO26-Vir; 3, 4 – локус 1pVM01; 5, 6 – локус 1p417H-90; 7, 8 – локус 1pNDM102337; 9, 10 – локус 1pChi7122-2, 11, 12 – локус 3pO26-Vir; контрольные образцы – 1, 3, 5, 7, 9 и 11; облученные образцы – 2, 4, 6, 8, 10 и 12.



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации локусов 2pNDM102337, 1pChi7122-3, 4pO26-Vir, 1pO86A1, 4pVM01. М – маркер молекулярной массы ДНК “М16” (Сибэнзим, Россия); 1, 2 – локус 2pNDM102337; 3, 4 – локус 1pChi7122-3; 5, 6 – локус 4pO26-Vir; 7, 8 – локус 1pO86A1; 9, 10 – локус 4pVM01; контрольные образцы – 1, 3, 5, 7 и 9; облученные образцы – 2, 4, 6, 8 и 10.

ров и рекомбинации внутри амплифицируемых фрагментов ДНК.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет 2030).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова П.Ю. Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах: Автореф. дис. ...докт. биол. наук. Обнинск: ВНИИРАЭ, 2020. 42 с.
2. Маргулис М.А., Маргулис И.М. О механизме биологического действия ионизирующей радиации // Журн. физ. химии. 2005. Т. 79. № 6. С. 1142–1151.
3. Медведев А.П., Алешкевич В.Н. Физико-химические факторы, влияющие на микроорганизмы // Ветерин. журн. Беларуси. 2017. № 1(6). С. 26–29.
4. Кобялко В.О., Пименов Е.П. Действие радиации на микроорганизмы и чувствительность разных таксономических групп к облучению // Актуал. вопр. с.-х. радиобиологии. Тр. ВНИИ РАЭ. Обнинск: 2019. С. 119–130.
5. Shuryak I. Review of microbial resistance to chronic ionizing radiation exposure under environmental conditions // J. Envir. Radioactivity. 2019. № 196. P. 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.10.012>
6. Beblo-Vranesevic K., Bohmeier M., Perras A.K. et al. Lack of correlation of desiccation and radiation tolerance in microorganisms from diverse extreme environments tested under anoxic conditions // FEMS Microbiol. Letters. 2018. № 365(6). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny044>
7. Болсуновский А.Я., Дементьев Д.В., Фролова Т.С. и др. Влияние гамма-излучения на уровень повреждений ДНК в клетках проростков *Allium cepa* L. // ДАН. 2019. Т. 489. № 2. С. 199–204. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524892199-204>
8. Belli M., Tabocchini M.A. Ionizing radiation-induced epigenetic modifications and their relevance to radiation protection // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21(17). P. 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21175993>
9. Gallyamova M.Yu. Study of radioprotective properties of drugs based on *E. coli* metabolites and substances of natural origin // Ветерин. врач. 2021. № 2. P. 16–18. <https://doi.org/10.33632/1998-698X.2021-2-16-19>
10. Bruckbauer S.T., Cox M.M., Sussman M.R. et al. Ionizing radiation-induced proteomic oxidation in *Escherichia coli* // Mol. Cell. Proteomics. 2020. V. 19(8). P. 1375–1395. <https://doi.org/10.1074/mcp.ra120.002092>
11. Levien E., Min J., Kondev J. et al. Non-genetic variability in microbial populations: Survival strategy or nuisance? // Rep. on Progress in Physics. 2021. V. 84(11). P. 116601. <https://doi.org/10.1088/1361-6633/ac2c92>

12. Yu D., Banting G., Neumann N.F. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli* // Canadian J. Microbiol. 2021. V. 67(8). P. 553–571. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>
13. Burby P.E., Simmons L.A. Regulation of cell division in bacteria by monitoring genome integrity and DNA replication status // J. Bacteriology. 2020. V. 202(2). <https://doi.org/10.1128/JB.00408-19>
14. Cooper T.F. Recombination speeds adaptation by reducing competition between beneficial mutations in populations of *Escherichia coli* // PLoS Biology. 2007. V. 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050225>
15. Andryukov B.G., Somova L.M., Matosova E.V. et al. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review) // Sovremen. Tehnologii v Medicine. 2019. V. 11(2). P. 164–182. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
16. Тестов Б.В. Действие радиации на организм // Акт. вопр. совр. науки. 2012. Т. 21 № 2. С. 6–13.
17. Nikitin A.I., Gaizatullin R.R., Koniukhov G.V. et al. Study of radioprotective properties of *E. coli* metabolites // Int. J. Pharmacy and Technology. 2016. V. 8(2). P. 14328–14340.
18. Ишмухаметов К.Т., Низамов Р.Н., Саитов В.Р. и др. Разработка радиомодифицированных мутантов микроорганизмов для профилактики и лечения радиационных поражений животных // Уч. записки Казанской гос. акад. ветерин. медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. Т. 241. № 1. С. 95–98. <https://doi.org/10.31588/2413-4201-1883-241-1-95-99>
19. Matic I. Mutation rate heterogeneity increases odds of survival in unpredictable environments // Mol. Cell. 2019. V. 75(3). P. 421–425. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.029>
20. Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М. и др. О некоторых путях формирования радиационно-индуцированного адаптивного ответа // Радиационная биология. Радиозэкология. 2017. Т. 57. № 6. С. 565–572. <https://doi.org/10.7868/S0869803117060017>
21. Тарасова Е.Ю., Матросова Л.Е., Хаммадов Н.И. и др. Исследование ДНК-повреждающего действия микотоксинов на фоне использования средств профилактики // Ветеринарный врач. 2021. № 3. С. 65–71. <https://doi.org/10.33632/1998-698X.2021-3-65-71>
22. Галлямова М.Ю., Вагин К.Н., Низамов Р.Н. и др. Фенотипическая изменчивость *E. coli*, индуцированная  $\gamma$ -лучами  $^{60}\text{Co}$  // Ветеринарный врач. 2021. № 3. С. 19–23. <https://doi.org/10.33632/1998-698X.2021-3-19-23>
23. Коба В.В., Жаворонкова М.К. Прямое и косвенное действие ионизирующего излучения на биологические объекты // Сб. трудов Междунар. научно-техн. конф. молодых ученых БГТУ им. В.Г. Шухова. Белгород, 2015. С. 228–232.
24. Низамов Р.Н., Галлямова М.Ю., Савкин И.В. и др. Направленное изменение фенотипа бактерий *E. coli* и *B. bifidum* с использованием ионизирующей радиации // Молодеж. разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК. Матер. Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 90-летию образования Казанской зоотехнической школы. Казань: 2020. С. 335–337.
25. Сафонова В.Ю. Антиоксидантные свойства некоторых радиозащитных препаратов // Изв. Оренбургского гос. аграр. ун-та. 2014. №. 2. С. 149–151.

## Analysis of Genome Variability of *Escherichia coli* when Exposed to Ionizing Radiation

M. Yu. Gallyamova<sup>1</sup>, K. N. Vagin<sup>1, 2, \*</sup>, N. M. Vasilevsky<sup>1</sup>, N. I. Hammadov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, 420075 Russia

<sup>2</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

\*e-mail: kostya9938@yandex.ru

The study of changes in the genetic apparatus of biological systems due to the influence of physical factors contributes to understanding the mechanisms of adaptation. The article is devoted to the analysis of the genome of the modified *Escherichia coli* PL-6 variant obtained as a result of repeated and gradually increasing exposure to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays at the Researcher facility. The integrity of the genetic material of the studied bacterial cells was checked by electrophoresis in 1.7% agarose gel. For the analysis of genome modifications, primers were designed to amplify several loci characterized by homology in a variety of *E. coli* strains. Based on the indicators of the number and size of amplified products using each of the presented primer combinations in *E. coli* before and after gamma irradiation, a significant change in the genome was established.

**Keywords:** genome, ionizing radiation, *Escherichia coli* PL-6, DNA damage, polymerase chain reaction.

УДК 582.736+575.174

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И КЛОНАЛЬНОСТЬ В ЛОКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ КАВКАЗСКОГО ЭНДЕМИКА *Trifolium polyphyllum* С.А. Меу. (Fabaceae)

О. Б. Зеленова<sup>1</sup>, М. А. Галкина<sup>2</sup>, В. Г. Онопченко<sup>1</sup>, И. А. Шанцер<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>2</sup>Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, 127276 Россия

e-mail: ischanzer@gmail.com

Поступила в редакцию 12.07.2023 г.

После доработки 10.08.2023 г.

Принята к публикации 16.08.2023 г.

*Trifolium polyphyllum* — эндемик Кавказа, отличающийся тем, что при принадлежности к семейству Fabaceae не фиксирует азот. Несмотря на это, вид изучен недостаточно, в частности ранее не было известно об особенностях его размножения и расселения. С помощью ISSR-анализа было установлено, что в популяции *T. polyphyllum* на горе Малая Хатипара присутствует как вегетативное, так и генеративное размножение особей, причем генеративное преобладает. При этом отдельные участки локальной популяции на площади около 2000 м<sup>2</sup> значительно генетически дифференцированы ( $\Phi_{iPT} = 0.349$ ,  $p = 0.001$ ), вероятно, за счет отсутствия у вида приспособлений для переноса семян. Мы также предполагаем, что наблюдаемая концентрация генетически смешанных особей в верхней части склонов связана с особенностями поведения опылителей. Площади, занимаемые вегетативными клонами не превышают 1 м<sup>2</sup>.

**Ключевые слова:** *Trifolium polyphyllum*, Тебердинский заповедник, альпийский пояс, субальпийский пояс, ISSR-маркеры, ITS 1–2, *trnL-trnF*, генетическая дифференциация, вегетативные клоны.

**DOI:** 10.31857/S0016675824010051

*Trifolium polyphyllum* С.А. Меу. — травянистый многолетник, эндемик Кавказа, викарирующий вид к европейскому клеверу *T. alpinum* L. [1]. Встречается в субнивальном поясе Большого Кавказа [2], в частности на Эльбрусе, в Верхней Сванетии [3], а также в Западном Закавказье и в Кабардино-Балкарии [4], в известняковых горах Западной Грузии [5]. *Trifolium polyphyllum* представляет особый интерес, поскольку на данный момент является единственным известным видом семейства Fabaceae холодных областей, не фиксирующим атмосферный азот [6, 7]. Анализ корневой системы показал практически полное отсутствие клубеньков [8].

*Trifolium polyphyllum* является одним из доминирующих видов сосудистых растений альпийских лишайниковых пустошей [9]. Альпийские пустоши в пределах Кавказского заповедника распространены в интервале высот 2000–2700 м [10]. Они развиваются в условиях малой мощности (менее 0.3 м) или отсутствия снежного покрова, поэтому характерны преимущественно

для выпуклых участков склонов, гребней хребтов и платообразных поверхностей. По мнению В.В. Акатова [11] распределение *T. polyphyllum* по массивам альпийских лугов и пустошей не соответствует его экологическим предпочтениям и может быть связано с ограничением поступления диаспор с других горных массивов и с отсутствием вида в субнивальном поясе.

Исследуемая популяция *T. polyphyllum* произрастает на Кавказе, где этот вид встречается в субальпийском, альпийском и субнивальном поясах, доходя до высот 3150–3180 м [12]. Однако этот вид не относится к специфичным видам субнивального пояса, поэтому встречается и на высоте ниже 3000 м. В работе А.В. Егорова и В.Г. Онопченко [13] *T. polyphyllum* был отмечен девять раз на склонах восточного, западного, южного румбов и на интервале крутизны склонов 30°–80°.

*Trifolium polyphyllum* относится к короткоцветущим растениям [14], цветет в июне–июле,

плодоносит в августе, боб одно–двухсемянный, семена бурые, около 2 мм в поперечнике [15]. Имеет стержневой корень, при этом диаметр площади захвата корневой системы очень обширен и составляет около 120 см [4]. С.Х. Шхагапсоев [4] указывает на наличие у *T. polyphyllum* вегетативного размножения. Отмершие листья довольно плотно окружают побеги текущего года, а надземные побеги образуют так называемую “подушку”. Согласно С.Х. Шхагапсоеву [4], у растения сильно развита партикуляция, однако пространственного разделения сформированных структур, способных к самостоятельному существованию, не происходит, и подземные побеги, выносимые на поверхность каждой партикулой, образуют единую “подушку”. На альпийских пустошах этот вид образует куртины площадью от 0.01 до 3 м<sup>2</sup> [8]. Для *T. polyphyllum* характерно слабое варьирование числа побегов по годам, что считается вызванным независимостью клональных растений от семенного размножения и приживаемости проростков в суровых условиях высокогорий [6].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о преобладании вегетативного размножения в высокогорных популяциях *T. polyphyllum*. Для проверки этого предположения и оценки размеров вегетативных клонов мы провели исследование генетического полиморфизма одной локальной популяции этого вида с горы Малая Хатипара Большого Кавказского хребта. В качестве генетических маркеров мы использовали межмикросателлитные участки ДНК (ISSR – inter simple sequence repeats). Этот мультилокусный метод анализа позволяет оценить вариабельность большей части генома, в том числе у видов, ранее не изученных в молекулярно-генетическом отношении [16], так как не требует предварительного знания последовательностей ДНК. Анализ межмикросателлитных участков ДНК позволяет оценить внутри- и межпопуляционную генетическую изменчивость, определить генетически идентичные особи, возникшие путем вегетативного размножения, и отличить их от растений семенного происхождения. Данный тип маркеров широко используется в популяционно-генетических исследованиях различных видов растений [17–21] благодаря его дешевизне, простоте и достаточно хорошей воспроизводимости результатов. В том числе, ISSR-маркеры неоднократно использовались в работах по изучению генетической структуры популяций разных видов клевера [22–28]. В наших собственных исследованиях мы успешно использо-

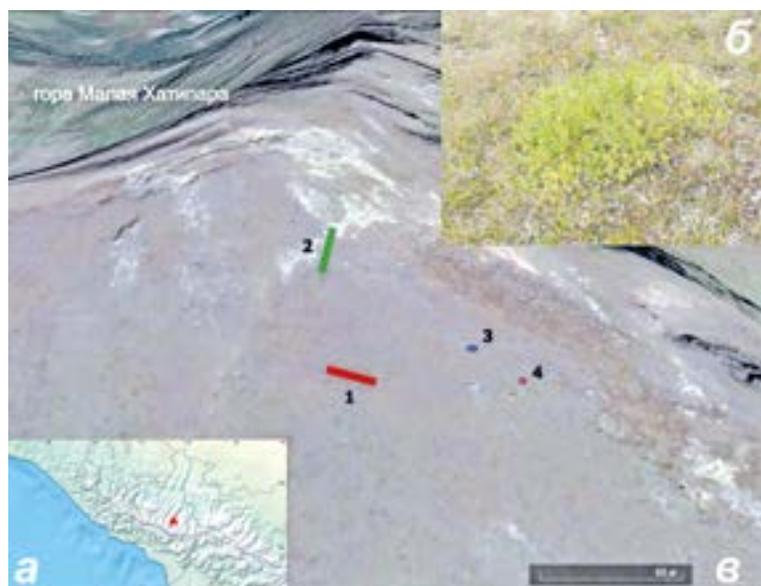
вали ISSR-маркеры для изучения генетической структуры популяций видов из различных групп растений, в том числе с целью выявления вегетативных клонов. Так, например, исследование ряда локальных популяций *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) позволило установить, что не только отдельные прибрежные сплавины у этого растения имеют чисто вегетативное происхождение, но и все сплавины на протяжении 5 км вдоль течения р. Усманка в Воронежской области представляют собой один единственный вегетативный клон [29]. При этом в других исследованных популяциях из Абхазии и Западной Украины наблюдается как вегетативное, так и семенное размножение. Другой пример можно привести из семейства Fabaceae. В ходе наших исследований генетической изменчивости популяций редкого полупустынного растения *Eversmannia subspinosa* (Fisch. ex DC.) V.Fedtsch. в Астраханской обл. и Калмыкии [30] нам удалось показать, что в популяции этого вида в Калмыкии присутствует как семенное, так и вегетативное размножение. При этом вся популяция северного макросклона горы Большое Богдо в Астраханской обл. представляет собой один вегетативный клон.

Задача настоящего исследования – определение степени распространенности вегетативного и семенного размножения в локальной популяции *T. polyphyllum* на одном из склонов горы Малая Хатипара и оценка пространственных размеров вегетативных клонов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала проводили в июле–августе 2021 г. на горе Малая Хатипара в Тебердинском национальном парке на высоте 2800 м. над ур. моря (рис. 1,а). На одном из склонов возле стационара Малая Хатипара в месте произрастания *T. polyphyllum* были заложены две трансекты (N43°26'51.2" E41°41'37.6"; N43°26'52.4" E41°41'37") размером 20 × 0.5 м, расстояние между которыми вдоль склона составляло 33 м. При этом вторая трансекта располагалась приблизительно (по показаниям анероида) на 5 м выше первой по вертикали, т. е. крутизна склона составляла около 9°.

Каждая из трансект была разделена на 20 участков 1 × 0.5 м, с краю которых отбирались образцы (второй снизу лист). Всего было отобрано 40 образцов. Также были выбраны две компактные “подушки” (рис. 1,б), располагавшиеся в отдалении от трансект (более 30 м) и на расстоянии око-



**Рис. 1.** *a* – Положение исследованной популяции на Кавказе (красный треугольник), *б* – “подушка” *T. polyphyllum* (фото В. Онипченко); *в* – расположение мест отбора образцов на горе Малая Хаттипара: 1 – первая трансекта, 2 – вторая трансекта, 3 – первая “подушка”, 4 – вторая “подушка”. Трансекты разбиты на прямоугольные участки 1 × 0.5 м, с которых отбирали образцы. Изображение горы получено с помощью сервиса Google Earth (<https://earth.google.com/web/>). Масштабная линейка 60 м.

ло 30 м друг от друга. С каждой “подушки” было взято по пять образцов, которые вошли в первую выборку вместе с образцами, собранными по всей длине двух трансект (табл. 1). Детально схема положения мест отбора образцов показана на рис. 1, *в*. Дополнительно было отобрано по 20 образцов с двух участков 1 × 0.5 м на каждой из трансект, эти образцы вошли во вторую выборку. Общая площадь исследованной локальной популяции составила около 2000 м<sup>2</sup>.

**Таблица 1.** Номера образцов *T. polyphyllum*, использованных для ISSR-анализа

	Выборка 1	Выборка 2
Трансекта 1	1–5, 7, 12–16, 19, 20, 44, 84, 86, 87, 95, 97	40–59
Трансекта 2	29–32, 34–38, 73, 108–111, 114–118	60–71, 73–79
“Подушка” 1	122–125, 127	–
“Подушка” 2	141–145	–

Примечание. Нумерация образцов связана не с их положением на трансектах, а с последовательностью их использования в анализе.

Помимо этого, с целью косвенной оценки системы размножения, нами были отобраны по 50 генеративных побегов с четырех площадок, расположенных на разных склонах и гребне хребта, всего 200 побегов. На них у 1746 цветков был произведен подсчет семязачатков и развивающихся семян в незрелых бобах. Для выделения ДНК из высушенных в силикагеле листьев использовали набор “ДНК-Экстран-3” (ООО “Синтол”, Москва). Использованные ISSR-праймеры с температурами отжига и числом полученных фрагментов приведены в табл. 2.

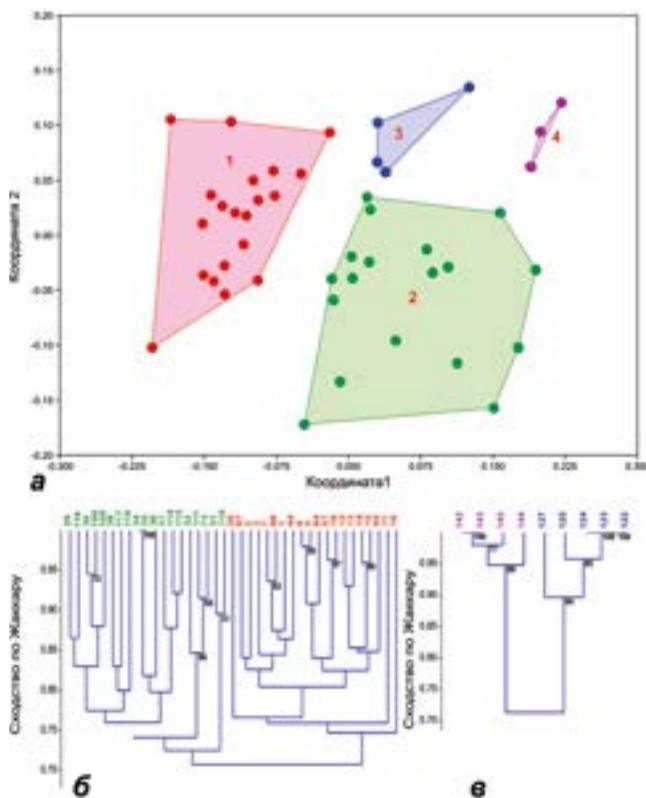
Реакционная смесь (20 мкл) содержала 10–20 нг ДНК, 20 пМ праймера и 4 мкл реакционной смеси MasterMix 5× MagDDMIX-2025 (200 мкМ каждого dNTP, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1.5 ед. Taq-полимеразы и буфер, Диалат Лтд., Россия). ПЦР с предварительной денатурацией (94°C – 3 мин) проводили в амплификаторе T-100 (BioRad Laboratories, США) в течение 35 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг при 37–50°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин +

**Таблица 2.** Использованные в работе ISSR-праймеры

Код праймера	Последовательность праймера	T отжига, °C	Число амплифицированных фрагментов в 1/2 выборках	Число полиморфных фрагментов в 1/2 выборках	% полиморфных локусов в 1/2 выборках
M2	(AC)8(C/T)G	50	16/5	11/1	68.8/20.0
M11	(CACA-CA)2(A/G)	37	13/0	12/0	92.3/0
M12	(CA)6RY	50	7/4	6/4	85.7/100
M13	(AGC)4(C/T)	50	8/8	5/3	62.5/37.5
HB13	(CAG)3GC	50	10/8	6/4	60.0/50.0
UBC841	(GA)8)YG	45	13/0	10/0	76.9/0

прибавление 2 с на каждый цикл с финальной элонгацией в течение 3 мин. Разделение продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1.7%-ном агарозном геле (Amresco, США) в 0.5× TBE (pH 8.3) буфере с окрашиванием бромидом этидия (0.5 мкг/мл) при 125 В в течение 1 ч 15 мин и фотографировали в УФ-свете. Фотографии электрофореграмм ISSR-маркеров типировали в программе Cross Checker 2.91 [31]. Типировались только четкие и воспроизводимые маркеры. Неясно амплифицированные маркеры кодировались как отсутствующие данные. В результате была получена матрица присутствия/отсутствия фрагментов одинаковой длины (1 – есть/ 0 – нет/? – нет данных).

Дальнейшую обработку матрицы проводили в программе PAST 4.06b [32] методами кластерного анализа (UPGMA) и неметрического мно-



**Рис. 2.** Результаты исследования первой выборки. *a* – Ординация методом N-MDS: 1 – первая трансекта, 2 – вторая трансекта, 3 – первая “подушка”, 4 – вторая “подушка”; *б* – кластеризация образцов первой и второй трансект методом UPGMA, дистанция Жаккара; *в* – кластеризация образцов первой и второй “подушек” методом UPGMA, дистанция Жаккара. Значения бутстреп-поддержки выше 60% показаны около соответствующих узлов. Образцы с первой трансекты обозначены красным цветом, со второй – зеленым; с первой “подушки” – синим, со второй “подушки” – малиновым.

гомерного шкалирования (N-MDS) с использованием дистанции Жаккара. Бутстреп-поддержки узлов дендрограмм оценивали по 100 репликам. Популяционно-генетические параметры выборок рассчитывали с помощью макроса GenAlEx 6.5 [33, 34] в MSExcel.

Полученная матрица была также проанализирована в программе Structure v. 2.3.4 [35] методом Байеса. Для каждого предполагаемого числа кластеров  $K$  от 1 до 7 проводили по три независимых запуска Марковских цепей Монте-Карло с 300000 предварительных итераций (burn-in) и 600000 основных итераций. Использовали модель генетического смешения (admixture) со скоррелированными частотами аллелей. Оптимальное число  $K$  определяли методом  $\Delta K$  [36], основанном на стандартизованном ускорении изменения логарифма функции вероятности  $\ln P(K)$ , с использованием программы Structure Harvester [37]. Столбчатые диаграммы распределения образцов по кластерам построены с использованием программы CLUMPAK [38].

Кроме этого, были секвенированы нуклеотидные последовательности ITS 1–2 участка ядерной ДНК и некодирующего межгенного спейсера *trnL-trnF* хлоропластной ДНК для восьми образцов *T. polyphyllum* с обеих трансект (образцы 1, 4, 29, 32, 44, 97, 114, 118) и четырех образцов из обеих “подушек” (122, 123, 144, 145). Для ПЦР использовались праймеры nnc18s10 и c26A для участка ITS 1–2 [39] и праймеры С и F для участка *trnL-trnF* [40]. Температура отжига составляла 58°C в обоих случаях. Очистку ПЦР-продукта для секвенирования осуществляли путем пересаживания продуктов ПЦР в смеси ацетата аммония с этанолом. Очищенный ПЦР-продукт был секвенирован в двух направлениях с теми же праймерами на ДНК-анализаторе 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, США) в ООО “Синтол” (Москва, Россия). Полученные нуклеотидные последовательности были выравнены вручную в программе BioEdit 7.0.5.3 [41]. Номера последовательностей, присвоенные GenBank NCBI: OQ058972–OQ058983 (ITS) и OQ067882–OQ067893 (*trnL-trnF*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Подсчет семязачатков и семян в завязях

Число семязачатков в завязях варьировало от одного до трех, в большинстве случаев их было два (в 1560 случаях из 1746). Оба семени завязались в 163 случаях, одно их двух – в 851 случае.

Таблица 3. Основные показатели генетического разнообразия в локальной популяции *T. polyphyllum*

“Популяция”	1 Трансекта	2 Трансекта	3 “Подушка”	4 “Подушка”	Всего
Число фрагментов	63	65	51	53	67
Число уникальных фрагментов	1	1	0	1	
<i>He</i> *	0.188 ± 0.026	0.236 ± 0.025	0.040 ± 0.016	0.017 ± 0.01	0.12 ± 0.012
<i>Na</i> *	1.33 ± 0.048	1.408 ± 0.047	1.076 ± 0.032	1.03 ± 0.019	1.211 ± 0.021
<i>I</i> *	0.278 ± 0.036	0.35 ± 0.035	0.056 ± 0.023	0.025 ± 0.015	0.177 ± 0.017
<i>P</i> *	52.24	64.18	8.96	4.48	32.46 ± 15.09

\* *He* – средняя ожидаемая гетерозиготность, \**Na* – эффективное число аллелей, \**I* – информационный индекс Шеннона, \**P* – процент полиморфных локусов.

В 666 случаях завязывания семян в бобах не произошло, что мы интерпретировали как отсутствие оплодотворения. В целом по выборке завязываемость семян составила 0.3 (1070 из 3546 семязачатков).

#### Секвенированные последовательности

Все секвенированные последовательности, как ядерные ITS, так и пластидные *trnL-trnF*, оказались идентичными и в дальнейшем анализе не рассматривались.

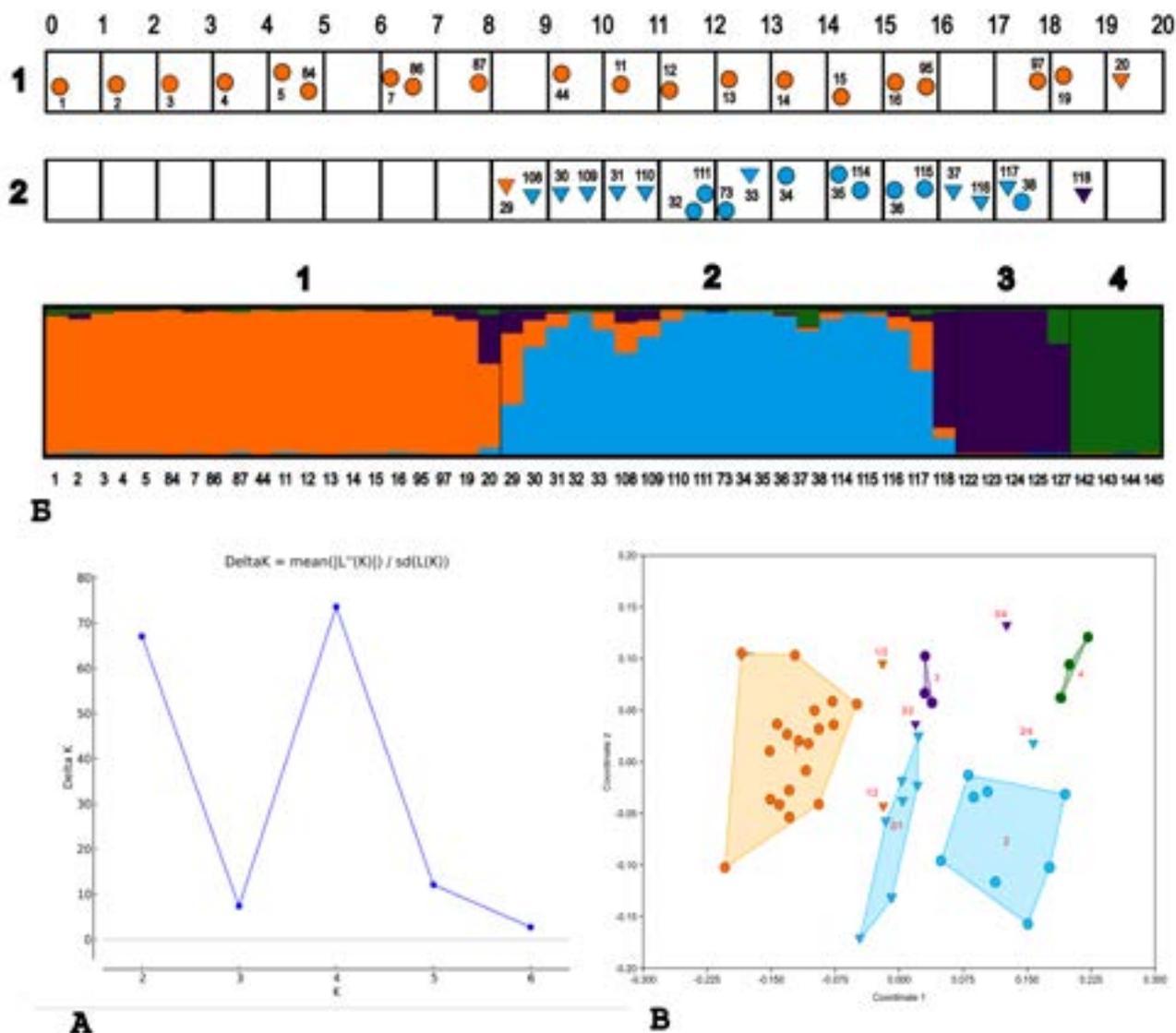
#### Межмикросателлитные (ISSR) маркеры

Первая выборка. По первой выборке было в общей сложности получено 67 маркеров (табл. 3) для 49 образцов. С одним из образцов из второй “подушки” ПЦР не удалось провести, поэтому он был исключен из дальнейшего анализа и число образцов здесь было сокращено до четырех. Анализ полученной матрицы разделил все образцы (2 трансекты и 2 “подушки”) методом неметрического многомерного шкалирования (NMDS) на четыре не перекрывающиеся группы (рис. 2,а). Из этого анализа был исключен образец 33 со второй трансекты, как резко отличавшийся ото всех остальных, вероятно, из-за большого числа (8) плохо амплифицированных фрагментов, обозначенных как отсутствующие данные. Дополнительно проведенный кластерный анализ (UPGMA, дистанция Жаккара) показал, что все образцы, отобранные с трансект, кроме двух, различаются по составу ISSR фрагментов (рис. 2,б). Образцы 34 и 35 со второй трансекты оказались идентичными. Несмотря на низкие бутстреп поддержки большинства узлов (что мы связываем с небольшим числом полученных маркеров) анализ однозначно показал генетическую гетерогенность выборки. Напротив, среди образцов, отобранных с “подушек”, идентичными по составу ISSR-фрагментов оказались 3 из 5 образцов с первой “подушки” и 2 из 4 – со второй. Бутстреп поддержки в данном случае оказались высокими (рис. 2,в).

Результаты анализа популяционной структуры, проведенного в GenAlEx, приведены в табл. 3. Для целей анализа каждая трансекта и “подушка” рассматривались как отдельные “популяции”.

Индекс генетического сходства *N<sub>ei</sub>* варьировал от 0.895 между двумя трансектами до 0.724 между первой трансектой и второй “подушкой”. Между двумя “подушками” он составил 0.771. Соответственно, генетические дистанции *N<sub>ei</sub>* (*h*) варьировали от 0.111 между двумя трансектами до 0.322 между 1 трансектой и второй “подушкой”. Анализ молекулярной изменчивости AMOVA показал, что 65% изменчивости приходится на полиморфизм внутри “популяций” и 35% – на изменчивость между ними. При этом среднее значение *PhiPT* (аналог *F<sub>st</sub>* для мультилокусных маркеров), оценивающее степень генетической дифференциации “популяций” оказалось равным 0.349 (*p* = 0.001). Парные значения *PhiPT* варьировали от 0.247 между трансектами до 0.725 между “подушками”.

Анализ в программе STRUCTURE определил оптимальное число генетических кластеров равным четырем согласно критерию  $\Delta K$  (рис. 3,а). Образцы обеих трансект и “подушек” оказались отнесены каждая к своему кластеру с разной степенью генетического смешения. Столбчатая диаграмма вероятностей отнесения образцов к разным кластерам и распределение этих образцов в пределах двух трансект показаны на рис. 3,б. На схемах трансект кружками обозначены образцы, вероятность отнесения которых к соответствующему кластеру выше 95%, а треугольниками – генетически смешанные образцы. Цвет значка соответствует наибольшей вероятности отнесения образца к тому или иному кластеру. Как видно из рис. 3,б, все образцы с первой трансекты, кроме одного, оказались генетически сходными и отнесенными к первому кластеру с вероятностью выше 95%. То же самое можно сказать и о “по-



**Рис. 3.** Результаты исследования первой выборки в программе STRUCTURE. *a* – График  $\Delta K$ ; *б* – столбчатая диаграмма апостериорных вероятностей отнесения образцов к генетическим кластерам для  $K = 4$  и расположение образцов на трансектах, кружками обозначены образцы с вероятностью отнесения к соответствующему кластеру  $>95\%$ , треугольниками – генетически смешанные образцы, цвет соответствует кластеру, к которому образец относится с наибольшей вероятностью, трансекты и расположение образцов на них изображены схематично; *в* – ординация методом NMDS, обозначения образцов те же, цифры указывают номера кластеров, дроби – номера кластеров, к которым образец относится с наибольшей/меньшей вероятностью. Трансекты и расположение образцов на них изображены схематично над столбчатой диаграммой и обозначены соответственно цифрами 1 и 2.

душках”: из пяти образцов первой “подушки” четыре отнесены к соответствующему 3-му кластеру со 100%-ной вероятностью, а один показывает некоторое генетическое смешение с кластером 4 (вторая “подушка”). Все четыре образца из второй “подушки” отнесены к 4-му кластеру со 100%-ной вероятностью. Иная картина наблюдается на второй трансекте. Здесь значительное число образцов оказались генетически смешанными с первой трансектой, а один – с 3-м кластером (первая “подушка”). Эти же данные были проанализированы методом неметрического

многомерного шкалирования (NMDS), результаты которого показаны на рис. 3, в. Из рисунка хорошо видно, что генетически не смешанные образцы образуют наиболее удаленные друг от друга группы, а генетически смешанные располагаются между соответствующими группами.

Вторая выборка. Данная выборка состояла из 40 образцов, взятых по 20 с одного из участков каждой из трансект с целью более тщательно оценить клональное происхождение близко расположенных образцов. Всего по этой выборке

было в получено 25 маркеров, что связано, с одной стороны, с меньшим генетическим разнообразием на участке малой площади, а с другой — плохой амплификацией фрагментов с частью праймеров. Выборка была проанализирована методами NMDS и кластерного (UPGMA) анализа. На диаграмме разброса NMDS (рис. 4,а) четко разделены образцы, происходящие с двух трансект. Внутри каждого облака они образуют группы генетически более близких образцов. Кластерный анализ (рис. 4,б) не разделил образцы с двух трансект на отдельные кластеры, но выявил несколько групп генетически идентичных или почти идентичных образцов. Это образцы: 40+41+43+46+53; 42+45+55; 48+49; 44+50+51 — с первой трансекты и 60+69+70+71; 61+62+64+67+75+77+79; 73+74; 63+78 — со второй трансекты. Остальные образцы оказались генетически отличными от них.

ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие каких-либо различий между исследованными образцами по нуклеотидным последовательностям ITS и *trnL-trnF* не вызывает удивления, так как все они относятся к одной популяции единственного вида, а внутривидовой полиморфизм по таким маркерам встречается достаточно редко. Проведенный анализ ISSR-маркеров выявил внутривидовой полиморфизм, однако он оказался неожиданно высоким. По такому параметру, как генетическая дистанция Неи, различия между трансектами и “подушками” оказались выше (0.111–0.321), чем между географически разделенными популяциями *T. pratense* L. со всей территории Литвы (от 0.041 до 0.14), также определенными по сходному числу (79) ISSR-маркеров [42]. В цитируемой работе анализ молекулярной изменчивости AMOVA показал, что только 17% общей изменчивости приходится на межпопуляционный полиморфизм, что вдвое ниже, чем в нашем случае четырех участков одной локальной популяции. В работе, посвященной сравнительному изучению генетического полиморфизма двух однолетних самоопыляемых видов клевера *T. steudneri* Schweinfur и *T. quartinianum* A. Rich в Эфиопии [23] авторы также использовали близкое число ISSR-маркеров (87). Согласно их расчетам AMOVA, на межвидовой полиморфизм двух близких видов пришлось 28.93% общей изменчивости, а 71.07% — на внутривидовую изменчивость, что ниже, чем в нашем случае у *T. polyphyllum*. Хотя авторы не рассчитывали генетические дистанции между этими видами и их

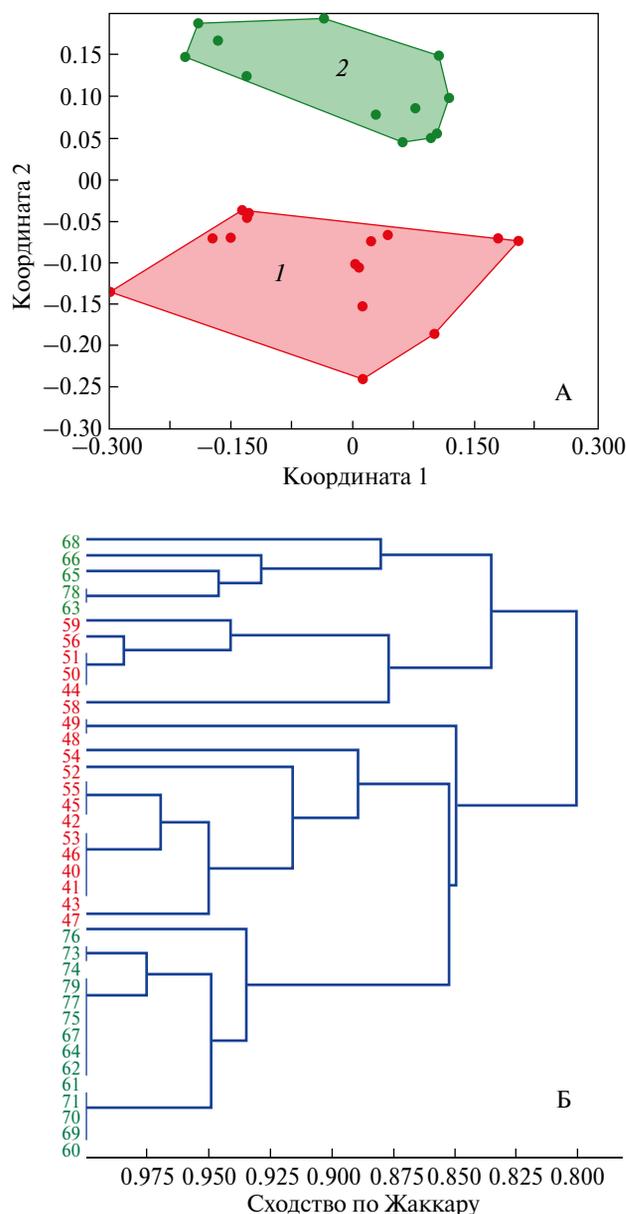


Рис. 4. Результаты анализа образцов второй выборки. а – Ординация методом NMDS, 1 – первая трансекта, 2 – вторая трансекта; б – кластеризация образцов с первой и второй трансект методом UPGMA, дистанция Жаккара; образцы с первой трансекты обозначены красным цветом, со второй – зеленым.

изученными популяциями, приведенные цифры достаточно ярко характеризуют исключительно высокую генетическую дифференциацию в пределах изученной нами локальной популяции *T. polyphyllum*. Об этом же говорят и весьма высокие значения PhiPT, сравнимые со значениями генетической дифференциации, наблюдаемыми для географических популяций и близких видов клевера [24], получаемых по данным ISSR-маркирования. Вместе с тем, внимательное изучение полученных нами результатов анализа

в программе STRUCTURE и характера распределения образцов разных кластеров на местности выявляет интересную закономерность. Если для первой трансекты и обеих “подушек” характерно полное преобладание образцов, однозначно отнесенных программой к соответствующим кластерам, то на второй трансекте преобладают генетически смешанные образцы. Генетическое смешение идет, преимущественно, с образцами первой трансекты. Так как последняя, а также и обе “подушки”, располагались ниже на том же самом склоне, мы предполагаем, что причина генетического смешения не может быть связана с приносом семян с выше расположенных частей склона, которые теоретически могут перемещаться талыми водами. Семена *T. polyphyllum* относительно крупные (ок. 2 мм) и не имеют специальных приспособлений для распространения, так что после созревания они высыпаются в непосредственной близости от материнских растений. Это, вероятно, создает предпосылки для столь мелкокомасштабной генетической дифференциации в пределах одной локальной популяции.

Однако проявление эффектов генетического смешения в расположенных выше по склону участках популяции выглядит довольно загадочно. Объяснение этого явления на наш взгляд может быть связано с сочетанием двух факторов: системы размножения *T. polyphyllum* и локальными особенностями поведения опылителей. Высокий уровень генетического полиморфизма при низкой завязываемости семян позволяет с уверенностью предположить, что *T. polyphyllum*, как и большинство изученных в этом отношении многолетних видов клевера [43–46], является облигатно перекрестно опыляемым самонесовместимым видом. Низкая, около 30%, завязываемость семян может быть связана не только с внутренними факторами и условиями окружающей среды [47–49], но и с низкой активностью опылителей, которая наблюдалась нами непосредственно в полевых условиях. Об этом, в частности, свидетельствует и тот факт, что около трети цветков вообще не завязала семян, вероятно, из-за отсутствия оплодотворения. Все виды клевера опыляются преимущественно разными видами шмелей и, в меньшей степени, пчел [50, 51].

Согласно имеющимся данным специальных исследований, проводившихся в горных районах Швеции и Северной Америки, шмели предпочитают строить свои гнезда в зоне альпийских и субальпийских лугов, более богатых источниками

пищи [52, 53]. При этом радиус активности шмелиной семьи никогда не превышает 1 км, а нередко и меньше 300 м [54, 55]. Мы предполагаем, что в нашем случае гнезда шмелей, опыляющих *T. polyphyllum*, расположены в более низких частях склона. Вероятно, растения на второй трансекте, расположенной дальше всех от предполагаемых мест размещения гнезд, посещаются ими в последнюю очередь. Мы полагаем, что именно из-за такого однонаправленного переноса пыльцы, генетическое смешение наблюдается преимущественно на выше расположенной трансекте. Дополнительным фактором, который может стимулировать однонаправленное перемещение опылителей, может быть ветер, дующий вдоль склона в направлении вершины горы. Анализ данных метеостанции пос. Теберда (<https://www.meteoservice.ru/archive/teberda/>) за июнь и июль 2019 г. и 2022 г. во время цветения *T. polyphyllum* показывает, что в это время преобладают северные ветра, по силе варьирующие от 1 до 5 м/с, часто с порывами до 10–12 м/с. За эти два месяца ветра южных румбов наблюдались только в течение шести дней в 2019 и пяти дней в 2022 г. Это означает, что на исследованном нами склоне горы Малая Хатипара практически постоянно дуют северные ветра слабой или умеренной силы в направлении от подножия к вершине, что может дополнительно сказываться на особенностях перемещения опылителей при посещении ими цветков клевера.

Таким образом, результаты нашего исследования однозначно свидетельствуют о преобладании семенного размножения у *T. polyphyllum*. Несмотря на это, на нескольких участках все же удалось выявить генетически идентичные или почти идентичные образцы. Неполная идентичность отдельных образцов может быть, в том числе, связана и с ошибками типирования. Такие генетически идентичные образцы были выявлены, главным образом, в “подушках” и во второй выборке при отборе образцов с побегов, располагавшихся на близком расстоянии друг от друга. Мы полагаем, что они представляют собой раметы. На второй трансекте была выявлена единственная пара таких образцов (34 и 35), располагавшихся на расстоянии 92 см друг от друга. В других случаях расстояния точно не измерялись, однако учитывая, что размеры “подушек” были менее 1 × 1 м, а во второй выборке образцы отбирали с площадок 1 × 0.5 м, можно полагать, что размеры вегетативных клонов у *T. polyphyllum* не превышают 1 м<sup>2</sup>, а чаще оказываются и меньшими. Для сравнения, у *T. calcaricum* J.L. Collins

& T.F. Wieboldt – эндемика известняковых пустошей в предгорьях Аппалачей на востоке США, размеры вегетативных клонов были оценены с использованием флуоресцентно меченых ISSR-маркеров как достигающие 100 м в поперечнике [28]. При этом среди 46 исследованных образцов было выявлено только 14 генет. В нашем случае подавляющее большинство образцов представлено отдельными генетами (44 генеты из 49 образцов первой выборки).

Однако, учитывая размеры вегетативных клонов, здесь корректнее сравнивать результаты, полученные по второй выборке, в которой из 40 изученных образцов было выявлено 18 генет. Результаты, таким образом, оказываются сопоставимыми. Можно сказать, что в изученной популяции *T. polyphyllum* умеренно присутствует вегетативное размножение, однако размеры клонов невелики и семенное размножение преобладает. Обнаруженная нами значительная генетическая дифференциация в пределах одной локальной популяции *T. polyphyllum* делает этот вид интересным модельным объектом для изучения микроэволюционных процессов у растений и их связи с опылителями и особенностями переноса семян и пыльцы.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ГBS РАН № 122042700002-6 (М.А. Галкина, И.А. Шанцер) и при финансовой поддержке исследовательской программы Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-15-2021-1396) (О.Б. Зеленова, В.Г. Онипченко). Авторы также благодарят Министерство науки и высшего образования РФ за поддержку ЦКП “Гербарий ГBS РАН”, грант № 075-15-2021-678, на базе которого проведено молекулярно-генетическое исследование.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аджиев Р.Б., Онипченко В.Г.* Восстановление биомассы надземных побегов альпийских растений после дефолиации // Тр. Тебердин. гос. заповедника. 2004. Вып. 21. С. 16–29.
2. *Гамцемлидзе З.Г.* Структура и ритм развития растений субнивального пояса Центрального Кавказа. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Тбилиси, 1980. 25 с.
3. *Нахуцришвили Г.Ш., Гамцемлидзе З.Г.* Жизнь растений в экстремальных условиях высокогорий (на примере Центрального Кавказа). Л.: Наука, 1984. 124 с.
4. *Шхагапсоев С.Х.* Эколого-биологические особенности редких и исчезающих растений Кабардино-Балкарии. Нальчик: КБГУ, 1994. 120 с.
5. *Нозадзе Л.М.* Микосимбиотрофизм травянистых растений известняковых гор Западной Грузии // Микориза и другие формы консортивных связей в природе. Пермь, 1987. С. 29–36.
6. *Makarov M.I., Onipchenko V.G., Malysheva T.I. et al.* Determinants of 15N natural abundance in leaves of co-occurring plant species and types within an alpine lichen heath in the Northern Caucasus // Arctic, Antarctic, Alpine Research. 2014. V. 46. P. 581–590.
7. *Макаров М. И., Онипченко В.Г., Мальшева Т.И., и др.* Симбиотическая азотфиксация бобовыми растениями альпийских экосистем: вегетационный эксперимент // Экология. 2021. № 1. С. 12–20.
8. *Аксенова А.А., Онипченко В.Г.* Оценка влияния *Trifolium polyphyllum* на состав альпийских пустошей // Тр. Тебердин. гос. заповедника. 2003. Вып. 20. С. 114–117.
9. *Онипченко В.Г.* Структура, фитомасса и продуктивность альпийских лишайниковых пустошей // Бюлл. Моск. о-ва испытателей природы, отд. биол. 1985. Т. 90. № 1. С. 59–66.
10. *Акатов В.В., Акатова Т.В.* Изменения фитоценозов высокогорных лугов и пустошей Лагонакского нагорья (Западный Кавказ) за последние 15–20 лет // Растительность России. 2012. № 21. С. 3–12.
11. *Акатов В.В.* Роль межценотических миграций растений в формировании альпийских фитоценозов Западного Кавказа // Ботан. журнал. 1997. Т. 82. №10. С. 111–120.
12. *Nakhutsrishvili G., Gagnidze R.I.* Die subnivale und nivale Hochgebirgsvegetation des Kaukasus // Phytocoenosis. 1999. V. 11. № 2. P. 173–183.
13. *Егоров А.В., Онипченко В.Г.* Ревизия субнивальной флоры Тебердинского заповедника // Тр. Тебердин. гос. заповедника. 2003. Вып. 20. С. 54–59.
14. *Курашев А.С.* Антэкология энтомофильных альпийских растений северозападного Кавказа. II. Продолжительность и ритмика цветения // Юг России: экология, развитие. 2012. № 2. С. 59–67.
15. *Бобров Е.Г.* Род 792. Клевер – *Trifolium* L. // Флора СССР. Т. 11. М., Л.: Изд. АН СССР, 1945. С. 189–261.

16. Трифонова А.А., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М. Низкий уровень подразделенности популяций редкого вида *Allium regellianum* Becker ex Pjin Волгоградской области на основе данных ISSR-анализа // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 1. С. 30–37. <https://doi.org/10.17816/ecogen15130-37>
17. Dangi R.S., Lagu M.D., Choundhary L.B. et al. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers // BMC Plant Biology. 2004. № 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-13>
18. Wu Z.-h., Shi J., Xi M.-l. et al. Inter-Simple Sequence Repeat data reveals high genetic diversity in wild populations of the narrowly distributed endemic *Lilium regale* in the Minjiang river valley of China // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118831>
19. Wu W., Chen F., Yeh K., Chen J. ISSR analysis of genetic diversity and structure of plum varieties cultivated in Southern China // Biology. 2019. № 8. 2. <https://doi.org/10.3390/biology8010002>
20. Yan W., Li J., Zheng D., Friedman C., Wang H. Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers // PeerJ. 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.7173>
21. Vaishnav K., Tiwari V., Durgapal A. et al. Estimation of genetic diversity and population genetic structure in *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult. populations using DAMD and ISSR markers // J. Genetic Engineering and Biotechnology. 2023. № 21. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00497-7>
22. Dalla Rizza M., Real D., Reyno R. et al. Genetic diversity and DNA content of three South American and three Eurasiatic *Trifolium* species // Genet. and Mol. Biol. 2007. V. 30. № 4. P. 1118–1124.
23. Abate T., Tesfaye K., Fikru E., Mihret F. Application of ISSR-PCR to determine the genetic relationship and genetic diversity among *stuedneri* clover (*Trifolium stuedneri*) and *quartin* clover (*Trifolium quartinianum*) accessions of Ethiopia // Am. J. Biotechnol. Mol. Sci. 2014. V. 4. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.5251/ajbms.2014.4.1.1.14>
24. Nosrati H., Feizi M.H., Razban-Haghighi A., Seyed-Tarrah S. Impact of life history on genetic variation in *Trifolium* (Fabaceae) estimated by ISSR // Envir. and Exp. Biol. 2015. № 13. P. 83–88.
25. Lee Y., Huh M.K. Characterization of genetic structure of *Trifolium repens*, *T. pratense*, and *T. hybridum* using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers // Res. J. Pharmaceutical, Biol. and Chem. Sci. 2015. V. 6. № 2. P. 1988–1993.
26. Abate T. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers for genetic diversity studies in *Trifolium* species // Adv. in Life Sci. and Technology. 2017. № 55. P. 34–37.
27. Abate T., Tesfaye K. Genetic diversity study of *quartin* clover (*T. quartinianum*) accessions of Ethiopia using ISSR markers // Advances in Life Sci. and Techn. 2017. № 55. P. 23–33.
28. Oppmann E., Morris A.B. Assessing the clonal nature of running glade clover (*Trifolium calcaricum* J.L. Collins & T.F. Wieboldt; Fabaceae) // Castanea. 2021. V. 86. № 1. P. 117–124.
29. Schanzer I.A., Semenova M.V., Shelepova O.V., Voronkova T.V. Genetic diversity and natural hybridization in populations of clonal plants of *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) // Wulfenia. 2012. V. 19. P. 131–139.
30. Степанова Н.Ю., Федорова А.В., Шанцер И.А. О генетической структуре популяций *Eversmannia subspinosa* в России // Turczaninowia. 2023. V. 26. № 1. P. 83–94. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.26.1.9>
31. Buntjer J.B. Cross Checkerv. 2.91. 1999. Laboratory of Plant Breeding, Wageningen Agricultural University, Netherlands.
32. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Palaeontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontol. Electron. 2001. V. 4. [http://palaeoelectronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
33. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. № 6. P. 288–295.
34. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics. 2012. № 28. P. 2537–2539.
35. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
36. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620.
37. Earl D.A., von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genet. Res. 2012. V. 4. P. 359–361.
38. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. // Molec. Ecol. Resour. 2015. № 15. P. 1179–1191. doi 10.1111/1755-0998.12387
39. Wen J., Zimmer E. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Mol. Phylogen. Evol. 1996. № 6. P. 167–177.

- <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0069>
40. *Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Mol. Biol.* 1991. № 17. P. 1105–1109.
  41. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Ac. Symp. Series.* 1999. V. 41. P. 95–98.
  42. *Petrauskas G., Norkevičienė E., Bastruk-Hlodan L.* Genetic differentiation of red clover (*Trifolium pratense* L.) cultivars and their wild relatives // *Agriculture.* 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3390/agriculture13051008>
  43. *Nair R.M., Peck D.M., Rowe T.D. et al.* Breeding system in *Trifolium glanduliferum* (Fabaceae) // *New Zealand J. of Agricultural Res.* 2007. V. 50. № 4. P. 451–456. <https://doi.org/10.1080/00288230709510312>
  44. *Dhar R., Sharma N., Sharma B.* Ovule abortion in relation to breeding system in four *Trifolium* species // *Curr. Sci.* 2006. V. 91. № 4. P. 482–485. <http://www.jstor.org/stable/24093949>
  45. *Pritchard A.J., t'Mannetje L.* The breeding systems and some interspecific relations of a number of African *Trifolium* spp. // *Euphytica.* 1967. V. 16. P. 324–329. <https://doi.org/10.1007/BF00028938>
  46. *Morley F.H.W.* The mode of pollination in strawberry clover (*Trifolium fragiferum*) // *Australian J. of Exper. Agriculture* 1963. V. 3. P. 5–8. doi 10.1071/EA9630005
  47. *Pasumarty S.V., Matsumura T., Higuchi S., Yamada T.* Causes of low seed set in white clover (*Trifolium repens* L.) // *Grass and Forage Science.* 1993. V. 48. P. 79–83.
  48. *Buyukkartal H.N.B.* Causes of low seed set in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Fabaceae) // *African J. of Biotechnology.* 2008. V. 7. № 9. P. 1240–1249.
  49. *Dhar R., Sharma N., Sharma B.* Ovule abortion in relation to breeding system in four *Trifolium* species // *Curr. Sci.* 2006. V. 91. № 4. P. 482–485.
  50. *Rao S., Stephen W.P.* Bumble bee pollinators in red clover seed production // *Crop Science.* 2009. V. 49. P. 2207–2214. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.01.0003>
  51. *Palmer-Jones T., Forster I.W., Clinch P.G.* Observations on the pollination of Montgomery red clover (*Trifolium pratense* L.) // *New Zealand J. of Agricultural Res.* 1966. V. 9. № 3. P. 738–747. <https://doi.org/10.1080/00288233.1966.10431563>
  52. *Bowers M.A.* Bumblebee colonization, extinction, and reproduction in subalpine meadows in Northeastern Utah // *Ecology.* 1985. V. 66. № 3. P. 914–927.
  53. *Hatfield R.G., LeBuhn G.* Patch and landscape factors shape community assemblage of bumblebees, *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae), in montane meadows // *Biol. Conservation.* 2007. V. 139. P. 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.06.019>
  54. *Darvill B., Knight M.E., Goulson D.* Use of genetic markers to quantify bumblebee foraging range and nest density // *Oikos.* 2004. V. 107. P. 471–478.
  55. *Elliott S.E.* Subalpine bumble bee foraging distances and densities in relation to flower availability // *Envir. Entomology.* 2009. V. 38. № 3. P. 748–756.

## Genetic Differentiation and Clonality in a Local Population of the Caucasian Endemic *Trifolium polyphyllum* C.A. Mey. (Fabaceae)

O. B. Zelenova<sup>1</sup>, M. A. Galkina<sup>2</sup>, V. G. Onipchenko<sup>1</sup>, I. A. Schanzer<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

\*e-mail: ischanzer@gmail.com

*Trifolium polyphyllum* is a Caucasian endemic of the Fabaceae family peculiar for its inability of nitrogen fixation. Despite this unique trait, the species is insufficiently studied, in particular, little is known about its propagation and dispersal modes. Analyses of ISSR markers in a sample from a population at Malaya Khatipara Mountain revealed that the species is capable to both sexual and vegetative propagation; however, the former mode dominates. We found out that separate patches within a local population are considerably genetically differentiated within an area of about 2000 square meters ( $\Phi_{PT} = 0.349$ ;  $p = 0.001$ ). We suppose this may happen due to lack of adaptations to seed dispersal. We also suppose that the observed concentration of genetically admixed individuals in upper parts of slopes is due to peculiarities of pollinators' behavior. The size of vegetative clones does not exceed 1 square meter.

**Keywords:** *Trifolium polyphyllum*, Teberdinsky Reserve, alpine belt, subalpine belt, ISSR markers, ITS 1–2, *trnL-trnF*, genetic differentiation, vegetative clones.

УДК 636.32/.38:575.17

## ПОПУЛЯЦИИ ТУВИНСКИХ КОРОТКОЖИРНОХВОСТЫХ ОВЕЦ В СТРУКТУРЕ ГЕНОФОНДА ПОРОД ОВЕЦ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

С. В. Бекетов<sup>1,\*</sup>, Т. Е. Денискова<sup>2</sup>, А. В. Доцев<sup>2</sup>, Э. А. Николаева<sup>1</sup>, Н. А. Зиновьева<sup>2</sup>,  
М. И. Селионова<sup>3</sup>, Ю. А. Столповский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,  
Московская область, пос. Дубровицы, 142132 Россия

<sup>3</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

\*e-mail: svbeketov@gmail.com

Поступила в редакцию 09.06.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

С использованием 11 микросателлитных маркеров (OarCP49, INRA063, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB11, INRA005, SPS113, INRA23, MAF65, McM527) получены данные об уровнях изменчивости и степени дифференциации 24 популяций (1140 образцов) тувинской грубошерстной короткожирнохвостой овцы разных районов Республики Тыва и 24 пород овец (721 образец) различного происхождения, охватывающих основные овцеводческие районы Российской Федерации. В ходе анализа обнаружен высокий уровень генетической изоляции и изменчивости тувинских овец, а в общей структуре российских пород овец выявлена выраженная генетическая дивергенция на две большие группы, одна из которых объединяет тонкорунных и полутонкорунных овец, а другая – аборигенные грубошерстные породы северокавказского и азиатского происхождения.

**Ключевые слова:** тувинская овца, российские породы овец, микросателлиты, генетическая изменчивость, филогения, культурные и аборигенные породы.

**DOI:** 10.31857/S0016675824010068

Россия в силу своего географического положения, обширной территории и наличия разнообразных климатических зон отличается многочисленными локальными и трансграничными породами овец, которых по тем или иным хозяйственно полезным признакам относят к шерстному, мясо-шерстному, мясо-сальному, шубному (овчинному), смушково-молочному и мясо-шерстно-молочному направлениям. В последние десятилетия в связи с завозом специализированных пород из Европы и США в Российской Федерации стало развиваться молочное и мясное овцеводство, происходит качественное улучшение существующих пород и создаются новые породы и внутривидовые типы. Как пример можно упомянуть регистрацию в 2018 г. первой отечественной породы овец мясного направления – катумской, полученной путем скрещивания романовских овцематок с баранами породы катадин [1].

Примечательно, что на этом фоне аборигенные породы овец до сих пор не потеряли своего

экономического значения. Прежде всего, это касается степных и горных районов юга Сибири и Северного Кавказа, а также засушливых степей и полупустынных зон Южного Поволжья, Урала и Предкавказья, где сельское хозяйство традиционно ориентировано на отгонно-пастбищное скотоводство, в котором овцеводство играет ведущую роль.

Особенно интересна в этом отношении тувинская короткожирнохвостая овца – древняя автохтонная порода, характеризующаяся исключительной жизнеспособностью и приспособленностью к суровым природно-климатическим условиям Республики Тыва [2]. Генетическую структуру тувинской овцы изучали с использованием ISSR-маркеров [3] и микросателлитной пролиферации ДНК [4]. Тем не менее остается неизвестным, какое место занимают популяции тувинской короткожирнохвостой овцы в структуре генофонда отечественных культурных и аборигенных пород овец.

В настоящее время в Государственный племенной регистр Российской Федерации внесены 34 породы и породных типа овец российской селекции. Из них 12 – аборигенных, 4 породы, полученные простым воспроизводительным скрещиванием, и 18 синтетических, выведенных с привлечением трех и более пород [5]. Можно сказать, что на сегодняшний день для каждого овцеводческого региона Российской Федерации (Северный Кавказ, Поволжье, Центральный Федеральный округ, юг Урала и Сибири) с учетом его климатических, почвенных, кормовых и хозяйственных условий созданы адаптированные породы овец, комплексное изучение генофонда которых с использованием различных молекулярных методов началось примерно с 2015 г.

В частности, на основании ISSR-полиморфизма были проанализированы основные параметры генетического разнообразия восьми российских пород овец [6]. По данным STR-маркирования проведена дифференциация пород юга России [7] и 25 пород основных овцеводческих регионов страны [8]. С использованием ДНК-чипа Illumina OvineSNP50 BeadChip осуществлено генотипирование пород овец, относящихся к разным типам шерстного покрова [9], и с применением высокоплотного чипа Illumina Ovine Infinium HD BeadChip выполнен генетический анализ 11 аборигенных грубошерстных пород [10] и проведено сравнение местных российских и иранских овец [11]. По данным полиморфизма митохондриального гена CytB изучены гаплотипическая изменчивость и гаплогрупповая принадлежность 18 отечественных пород [12].

Однако до сих пор российские породы овец изучали путем сравнения их единичных выборок, в то время как самостоятельный интерес представляет исследование генофондов с привлечением в анализ нескольких популяций, что в наибольшей степени отражает генетическую структуру породы.

С этой целью нами было проведено изучение генетической дифференциации большой выборки аборигенной тувинской короткожирнохвостой овцы, представленной 24 популяциями, охватывающими по локализации большую часть территории Республики Тыва, в сравнении с 24 российскими породами овец различного происхождения, представленными отдельными выборками. Оценка изменчивости и степени

родства изучаемых пород проводилась по результатам STR-маркирования – метода, который до сих пор остается наиболее доступным и востребованным для проведения популяционно-генетических исследований [13].

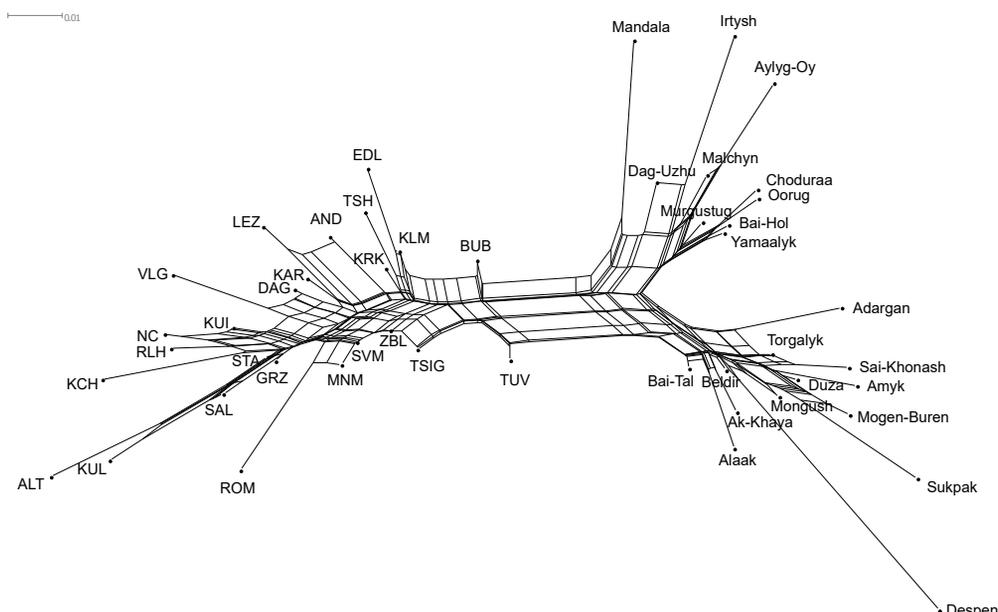
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами нашего изучения являлись официально зарегистрированные отечественные культурные и аборигенные породы овец разных направлений продуктивности, разводимые на территории Российской Федерации.

В соответствии с производственной и зоологической классификациями изучаемые породы образовали несколько подгрупп. В частности, подгруппу грубошерстных короткожирнохвостых овец сформировали сибирские аборигенные породы буубэй (BUB,  $n = 30$ ) и тувинская короткожирнохвостая овца, включающая 24 ( $n = 1140$ ) выборочные популяции, одна из которых (TUV,  $n = 30$ ) не идентифицирована по месту локализации, а 23 другие (TUV\_MULTIPLE,  $n = 1110$ ) были предоставлены разными овцеводческими хозяйствами девяти районов Республики Тыва, а именно: 1. Дзун-Хемчикский кожуун – Aylyg-Oy ( $n = 40$ ), Ak-Khaya ( $n = 48$ ), Dag-Uzhu ( $n = 48$ ), Bai-Tal ( $n = 50$ ); 2. Кызылский кожуун – Mongush ( $n = 50$ ), Irtysh ( $n = 50$ ); 3. Сут-Хольский кожуун – Alaak ( $n = 51$ ), Amyk ( $n = 49$ ); 4. Овюрский кожуун – Murgustug ( $n = 42$ ), Torgalyk ( $n = 50$ ), Adargan ( $n = 50$ ); 5. Эрзинский кожуун – Bai-Hol ( $n = 50$ ), Yamaalyk ( $n = 50$ ), Mandala ( $n = 50$ ); 6. Барун-Хемчикский кожуун – Sai-Khonash ( $n = 42$ ), Duza ( $n = 50$ ); 7. Бай-Тайгинский кожуун – Oogug ( $n = 50$ ), Sukpak ( $n = 50$ ); 8. Тес-Хемский кожуун – Despen ( $n = 40$ ), Choduraa ( $n = 50$ ), Beldir ( $n = 50$ ); 9. Монгун-Тайгинский кожуун – Malchyn ( $n = 50$ ), Mogen-Buren ( $n = 50$ ).

Подгруппа грубошерстных короткошестехвостых овец была представлена аборигенной среднерусской романовской породой (ROM,  $n = 30$ ), грубошерстных длинножирнохвостых овец – кучугуровской породой (KCH,  $n = 34$ ) и местными кавказскими: лезгинской (LEZ,  $n = 30$ ), андийской (AND,  $n = 30$ ), карачаевской (KAR,  $n = 30$ ), тушинской (TSH,  $n = 30$ ), а также аборигенной среднеазиатской каракульской породой (KAR,  $n = 32$ ). Из грубошерстных курдючных овец изучали эдильбаевскую (EDL,  $n = 30$ ) и калмыцкую (KLM,  $n = 30$ ) породы. Подгруппу полутонкорунных длиннотощехвостых овец образовали такие породы как цигайская (TSIG,  $n = 30$ ), гор-

**Рис. 1.** Neighbour-Net дендрограмма взаимоотношений исследуемых популяций и пород овец, построенная на основе матрицы попарных генетических дистанций  $F_{ST}$ .



ноалтайская (ALT,  $n = 30$ ), русская длинношерстная (RLH,  $n = 30$ ), северокавказская (NC,  $n = 30$ ) и куйбышевская (KUI,  $n = 30$ ).

Подгруппа тонкорунных длинношеих овец включала такие породы как волгоградская (VLG,  $n = 30$ ), сальская (SAL,  $n = 30$ ), грозненская (GRZ,  $n = 30$ ), дагестанская горная (DAG,  $n = 30$ ), кулундинская (KUL,  $n = 30$ ), ставропольская (STA,  $n = 32$ ), забайкальская (ZBL,  $n = 30$ ), манычский (MNM,  $n = 30$ ) и советский (SVM,  $n = 30$ ) мериносы.

Материалом для исследований являлись образцы ДНК из биобанка ИОГен РАН (23 популяции тувинской короткожирнохвостой овцы) и ОНИС БиоТехЖ (25 пород овец, включая одну выборку тувинской овцы – TUV). Исследование пород овец осуществляли по 11 STR-маркерам (авторская панель ОНИС БиоТехЖ) с использованием двух мультиплексных ПЦР-реакций 6 (OarCP49, INRA063, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB11) и 5 (INRA005, SPS113, INRA23, MAF65, McM527). Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР-реакции проводили на генетическом анализаторе ABI 3130x1 (Applied Biosystems, США) с последующим определением длин аллелей микросателлитов в программном обеспечении GeneMapper v 4.0. (Applied Biosystems).

Для оценки структуры пород и популяций использовали следующие показатели: наблюдаемая ( $H_o$ ) и несмещенная ожидаемая ( $H_{E(u)}$ ) ге-

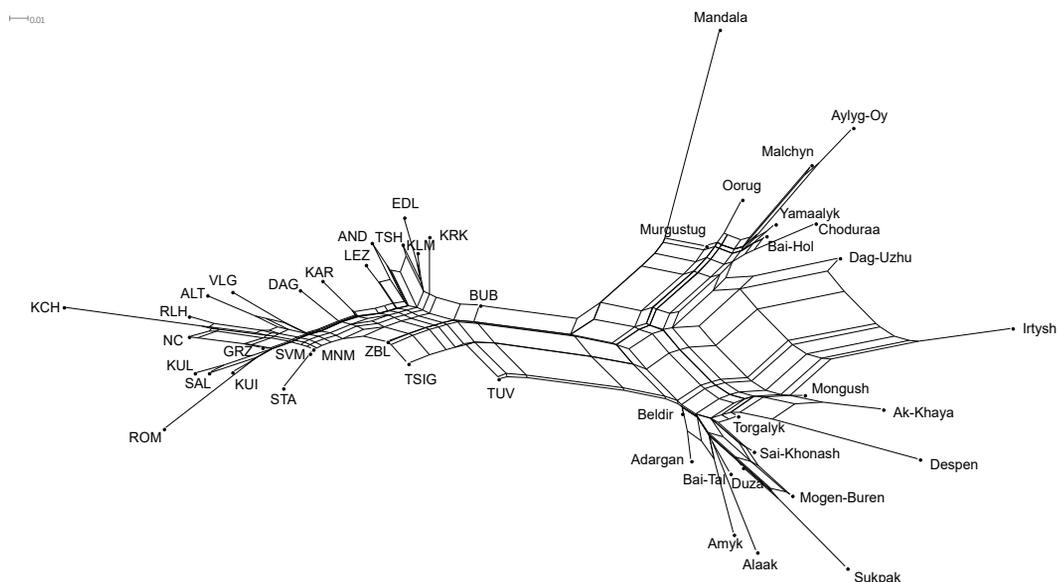
терозиготность, среднее число аллелей на локус ( $N_A$ ), число эффективных аллелей на локус ( $N_E$ ), количество информативных аллелей с частотой более 5% ( $N_A > 5\%$ ), аллельное разнообразие ( $A_R$ ), коэффициент инбридинга ( $F_{IS}$ ). Степень генетической дифференциации исследуемых популяций тувинской овцы оценивали на основании попарных генетических различий (индекс фиксации  $F_{ST}$ ) и попарных генетических дистанций по Jost's  $D$  [14].

Филогенетические отношения устанавливали путем построения Neighbor-Net дендрограмм [15]. Оценку генетической структуры пород и популяций осуществляли с помощью адмикс-модели. Анализ баз данных STR-вариабельности пород овец выполняли для  $K$  от 1 до 12, при условии, что длина burn-in периода – 50000 и модель Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) – 500000 повторов. Для каждого значения  $K$  выполняли 10 итераций.

Для формирования исходных файлов и проведения анализа использовали R версию 3.3.2 [16], программное обеспечение GenAlEx 6.5 [17] и R пакет “diveRsity”, STRUCTURE 2.3.4 [18] с последующей визуализацией в “porhelper” [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано в табл. 1, аллельное разнообразие в рассматриваемых выборках варьировало от  $6.895 \pm 0.892$  –  $9.420 \pm 0.818$  у тонкорунных и полутонкорунных овец до  $8.033 \pm 0.686$  –  $9.322 \pm 1.012$



**Рис. 2.** Neighbor-Net дендрограмма взаимоотношений исследуемых популяций и пород овец, построенная на основе матрицы попарных генетических дистанций Jost's  $D$ .

у грубошерстных. При этом минимальное среднее число аллелей на локус отмечали у кулундинской тонкорунной породы –  $7.20 \pm 0.98$  и наибольшее –  $10.32 \pm 0.19$  в объединенной группе популяций тувинских грубошерстных овец (TUV\_MULTIPLE). Число эффективных аллелей на локус имело наименьшее значение у грубошерстной кучугуровской породы –  $4.24 \pm 0.53$  и наибольшее в отдельной выборке тувинской грубошерстной овцы (TUV) –  $5.74 \pm 0.58$ .

Что касается параметров генетического разнообразия, то наблюдаемая гетерозиготность в группе тонкорунных и полутонкорунных овец была на уровне 48.9–89.1% и у грубошерстных пород – 51–97.7%, а ожидаемая – 69–82% и 76.1–82.2%, соответственно, что свидетельствует в пользу большего генетического разнообразия аборигенных пород овец.

Примечательно также, что во всех исследованных выборках за исключением пород бубэй, тувинской, забайкальской и цигайской был выявлен достоверный дефицит гетерозигот, который составил от 11.9 до 26.5% в группе тонкорунных и полутонкорунных овец и от 13.4 до 26.1% в группе грубошерстных пород (табл. 2). При этом среди пород с выявляемым родственным спариванием наибольшим уровнем генетического разнообразия и числом эффективных аллелей характеризовались каракульская порода и объединенная группа популяций тувинских овец (TUV\_MULTIPLE).

Следует отметить, что низкий уровень аллельного и генетического разнообразия, отмечаемый у тонкорунных и полутонкорунных овец, в значительной степени обусловлен общностью их происхождения. Изначально тонкорунное овцеводство в России создавалось на базе мелких разрозненных стад типа мазаевских и новокавказских меринсов, из которых впоследствии были сформированы крупные государственные хозяйства. Дальнейшая селекция с привлечением зарубежного племенного материала, прежде всего австралийских меринсов и американских рамбулье, привела к тому, что внутривидовые различия в продуктивности тонкорунных овец превысили межпородные [20]. В результате отечественные меринсовы породы стали мало различимы между собой не только по физиологическим, но и по внешним признакам [21].

По итогам Neighbour-Net кластеризаций можно видеть (рис. 1, 2), что тувинские овцы из разных районов Республики Тыва сформировали две крупные ветви, четко выраженные на дендрограмме, построенной на основе матрицы попарных генетических дистанций по  $F_{ST}$  (рис. 1), и менее структурированные на дендрограмме, построенной по Jost's  $D$  (рис. 2).

Согласно дендрограмме по  $F_{ST}$  одна ветвь (рис. 1) образована популяциями Mandala, Dag-Uzhu, Irtysh, Malchyn, Aylyg-Oy, Murgustug, Choduraa, Oorug, Bai-Hol, Yamaalyk, а вторая объединяет популяции Adargan, Torgalyk, Sai-Khonash, Amyk, Duza, Mogen-buren, Sukpak,

Mongush, Despen, Bai-Tal, Beldir, Ak-Khaya, Alaak, что соответствует внутривидовому подразделению тувинской короткожирнохвостой овцы на два селекционно-заводских типа – горный и степной [4].

На диаграмме по Jost's  $D$  (рис. 2) в группе тувинских овец горного типа наиболее консо-

лированными оказались популяции Oorug, Malchyn, Aylyg-Oy, Yamaalyk, Bai-Hol, Choduraa. Популяции овец степного типа образовали два самостоятельных, близко расположенных кластера – Beldir, Adargan, Bai-Tal, Amyk, Alaak, Duza, Sukpak, Mogen-buren и Despen, Ak-Khaya, Mongush, а популяция Torgalyk заняла промежуточное положение между ними. В то время как

**Таблица 1.** Параметры аллельного разнообразия исследуемых популяций пород овец

Порода	$n$	$N_A$	$N_E$	$N_A \geq 5\%$	$A_R$
Тонкорунные длинношестехвостые					
Волгоградская (VLG)	30	$8.90 \pm 1.22$	$5.08 \pm 0.70$	$5.80 \pm 0.63$	$8.165 \pm 1.049$
Сальская (SAL)	30	$8.50 \pm 0.92$	$5.05 \pm 0.63$	$5.90 \pm 0.64$	$7.990 \pm 0.839$
Грозненская (GRZ)	30	$9.00 \pm 1.14$	$4.92 \pm 0.62$	$5.40 \pm 0.67$	$8.230 \pm 0.954$
Дагестанская горная (DAG)	30	$9.00 \pm 1.07$	$5.45 \pm 0.82$	$5.40 \pm 0.86$	$8.361 \pm 0.972$
Кулундинская (KUL)	30	$7.20 \pm 0.98$	$4.42 \pm 0.72$	$5.30 \pm 0.70$	$6.895 \pm 0.892$
Ставропольская (STA)	32	$9.20 \pm 0.92$	$4.88 \pm 0.63$	$4.70 \pm 0.45$	$8.538 \pm 0.830$
Маньчжурский меринос (MNM)	30	$8.20 \pm 0.90$	$4.54 \pm 0.51$	$5.00 \pm 0.45$	$7.639 \pm 0.769$
Советский меринос (SVM)	23	$8.00 \pm 0.75$	$4.95 \pm 0.44$	$5.20 \pm 0.42$	$8.000 \pm 0.745$
Забайкальская тонкорунная (ZBL)	30	$8.90 \pm 0.77$	$5.32 \pm 0.53$	$6.00 \pm 0.45$	$8.381 \pm 0.682$
Среднее	265	$8.54 \pm 0.96$	$4.96 \pm 0.62$	$5.41 \pm 0.59$	$8.022 \pm 0.859$
Полутонкорунные длинношестехвостые					
Горноалтайская (ALT)	30	$8.50 \pm 0.99$	$4.28 \pm 0.70$	$4.80 \pm 0.61$	$7.766 \pm 0.847$
Куйбышевская (KUI)	30	$8.50 \pm 1.06$	$5.32 \pm 0.80$	$5.90 \pm 0.69$	$8.040 \pm 0.979$
Русская длинношерстная (RLH)	30	$8.00 \pm 0.79$	$4.28 \pm 0.51$	$4.90 \pm 0.41$	$7.417 \pm 0.681$
Северокавказская мясошерстная (NC)	30	$8.50 \pm 0.90$	$4.32 \pm 0.59$	$5.00 \pm 0.42$	$7.829 \pm 0.795$
Цигайская (TSIG)	30	$10.30 \pm 0.99$	$5.53 \pm 0.42$	$6.40 \pm 0.48$	$9.420 \pm 0.818$
Среднее	150	$8.76 \pm 0.95$	$4.75 \pm 0.60$	$5.4 \pm 0.52$	$8.094 \pm 0.824$
Грубшерстные длинножирнохвостые					
Карачаевская (KAR)	30	$9.20 \pm 1.10$	$5.25 \pm 0.72$	$5.70 \pm 0.63$	$8.546 \pm 0.980$
Тушинская (TSH)	30	$9.60 \pm 1.13$	$5.02 \pm 0.79$	$5.70 \pm 0.60$	$8.708 \pm 0.959$
Андийская (AND)	30	$8.70 \pm 0.98$	$4.80 \pm 0.58$	$5.40 \pm 0.65$	$8.092 \pm 0.890$
Лезгинская (LEZ)	30	$8.60 \pm 0.72$	$4.74 \pm 0.74$	$5.80 \pm 0.71$	$8.033 \pm 0.686$
Каракульская (KRK)	32	$10.00 \pm 0.91$	$5.75 \pm 0.86$	$5.40 \pm 0.76$	$9.099 \pm 0.829$
Кучугуровская (KCH)	34	$9.20 \pm 1.15$	$4.24 \pm 0.53$	$4.80 \pm 0.39$	$8.239 \pm 0.959$
Среднее	186	$9.22 \pm 1.00$	$4.97 \pm 0.70$	$5.47 \pm 0.62$	$8.453 \pm 0.884$
Грубшерстные короткошестехвостые					
Романовская (ROM)	30	$9.80 \pm 1.04$	$5.27 \pm 0.81$	$5.20 \pm 0.57$	$8.972 \pm 0.908$
Грубшерстные короткожирнохвостые					
Тувинская короткожирнохвостая (TUV_MULTIPLE)	1110	$10.32 \pm 0.19$	$5.37 \pm 0.13$	$5.67 \pm 0.10$	$8.764 \pm 0.133$
Тувинская короткожирнохвостая (TUV)	30	$10.10 \pm 1.16$	$5.74 \pm 0.58$	$6.30 \pm 0.52$	$9.322 \pm 1.012$
Буубэй (BUB)	30	$10.00 \pm 1.13$	$5.11 \pm 0.69$	$6.30 \pm 0.76$	$9.298 \pm 1.030$
Среднее	1170	$10.14 \pm 0.83$	$5.41 \pm 0.47$	$6.09 \pm 0.46$	$9.128 \pm 0.725$
Грубшерстные курдючные					
Эдильбаевская (EDL)	30	$9.30 \pm 1.21$	$4.66 \pm 0.71$	$5.30 \pm 0.72$	$8.173 \pm 1.113$
Калмыцкая курдючная (KLM)	30	$9.50 \pm 0.96$	$5.07 \pm 0.63$	$5.90 \pm 0.50$	$8.769 \pm 0.824$
Среднее	60	$9.40 \pm 1.09$	$4.87 \pm 0.67$	$5.6 \pm 0.61$	$8.471 \pm 0.969$

Примечание.  $n$  – объем выборки,  $N_A$  – среднее число аллелей на locus;  $N_E$  – число эффективных аллелей на locus;  $N_A \geq 5\%$  – число информативных аллелей с частотой более 5%;  $A_R$  – аллельное разнообразие.

выборочная популяция (TUV) характеризуется существенным генотипическим обособлением (рис. 1, 2). Сравнение значений наблюдаемой гетерозиготности  $H_o = 0.977$  и несмещенной ожидаемой гетерозиготности  $H_{E(u)} = 0.822$  в этой выборке указывает на то, что в ней преобладают аутбредные спаривания (табл. 2). Дело в том, что тувинских овец интенсивно используют в промышленных скрещиваниях с баранами сараджинской курдючной породы и удельный вес

таких помесных форм превышает 60% всего поголовья овец Республики Тыва [22].

Можно отметить, что на дендрограмме по Jost's  $D$  (рис. 2) две популяции Dag-Uzhu и Irtysh образовали дополнительный межгрупповой кластер, причем Dag-Uzhu в большей степени сближается с овцами горного типа, а Irtysh – степного. Действительно, в СПК “Иртиш” занимаются разведением тувинских овец степного

**Таблица 2.** Параметры генетического разнообразия исследуемых популяций и пород овец

Порода	$n$	$H_o$	$H_{E(u)}$	$F_{IS}$ (95%CI)
Тонкорунные длинношестехвостые				
Волгоградская (VLG)	30	0.525 ± 0.082	0.764 ± 0.048	0.339 [0.185; 0.493]
Сальская (SAL)	30	0.512 ± 0.089	0.777 ± 0.036	0.369 [0.185; 0.553]
Грозненская (GRZ)	30	0.540 ± 0.089	0.774 ± 0.033	0.336 [0.151; 0.521]
Дагестанская горная (DAG)	30	0.560 ± 0.079	0.787 ± 0.032	0.312 [0.156; 0.468]
Кулундинская (KUL)	30	0.489 ± 0.095	0.713 ± 0.054	0.336 [0.114; 0.558]
Ставропольская (STA)	32	0.575 ± 0.061	0.778 ± 0.028	0.274 [0.155; 0.393]
Маньчский меринос (MNM)	30	0.647 ± 0.055	0.766 ± 0.029	0.161 [0.058; 0.264]
Советский меринос (SVM)	23	0.651 ± 0.06	0.801 ± 0.021	0.192 [0.061; 0.323]
Забайкальская тонкорунная (ZBL)	30	0.891 ± 0.018	0.807 ± 0.022	-0.109 [-0.165; -0.053]
Среднее	265	0.599 ± 0.070	0.774 ± 0.034	0.246[0.100; 0.391]
Полутонкорунные длинношестехвостые				
Горноалтайская (ALT)	30	0.509 ± 0.084	0.690 ± 0.066	0.272 [0.096; 0.448]
Куйбышевская (KUI)	30	0.646 ± 0.052	0.780 ± 0.037	0.176 [0.079; 0.273]
Русская длинношерстная (RLH)	30	0.555 ± 0.066	0.738 ± 0.042	0.267 [0.142; 0.392]
Северокавказская мясошерстная (NC)	30	0.586 ± 0.053	0.738 ± 0.042	0.215 [0.133; 0.297]
Цигайская (TSIG)	30	0.873 ± 0.014	0.820 ± 0.019	-0.069 [-0.13; -0.008]
Среднее	150	0.634 ± 0.054	0.753 ± 0.041	0.172 [0.064; 0.041]
Грубошерстные длинножирнохвостые				
Карачаевская (KAR)	30	0.516 ± 0.087	0.777 ± 0.041	0.367 [0.184; 0.550]
Тушинская (TSH)	30	0.507 ± 0.081	0.761 ± 0.043	0.362 [0.200; 0.524]
Андийская (AND)	30	0.550 ± 0.074	0.770 ± 0.034	0.306 [0.154; 0.458]
Лезгинская (LEZ)	30	0.510 ± 0.070	0.743 ± 0.045	0.336 [0.214; 0.458]
Каракульская (KRK)	32	0.634 ± 0.047	0.798 ± 0.034	0.211 [0.142; 0.280]
Кучугуровская (KCH)	34	0.574 ± 0.059	0.740 ± 0.032	0.228 [0.083; 0.373]
Среднее	186	0.549 ± 0.070	0.765 ± 0.038	0.302[0.163; 0.441]
Грубошерстные короткошестехвостые				
Романовская (ROM)	30	0.651 ± 0.05	0.771 ± 0.044	0.143 [0.026; 0.260]
Грубошерстные короткожирнохвостые				
Тувинская короткожирнохвостая (TUV_MULTIPLE)	1110	0.601 ± 0.013	0.779 ± 0.006	0.234 [0.031; 0.435]
Тувинская короткожирнохвостая (TUV)	30	0.977 ± 0.017	0.822 ± 0.020	-0.196 [-0.276; -0.116]
Буубэй (BUB)	30	0.798 ± 0.023	0.787 ± 0.027	-0.023 [-0.105; 0.059]
Среднее	1170	0.792 ± 0.018	0.796 ± 0.018	0.050 [-0.117; 0.126]
Грубошерстные курдючные				
Эдильбаевская (EDL)	30	0.557 ± 0.073	0.739 ± 0.045	0.276 [0.149; 0.403]
Калмыцкая курдючная (KLM)	30	0.577 ± 0.071	0.784 ± 0.030	0.281 [0.134; 0.428]
Среднее	60	0.567 ± 0.072	0.762 ± 0.038	0.279 [0.142; 0.416]

**Примечание.**  $n$  – объем выборки,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность;  $H_{E(u)}$  – несмещенная ожидаемая гетерозиготность;  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга.

типа, а в “Даг-Ужу” – горного, однако согласно дендрограмме по  $F_{ST}$  (рис. 1) обе эти популяции попадают в группу горных овец, что может свидетельствовать о неоднородной генетической дифференциации тувинских овец даже в пределах одного внутривидового типа.

В пользу этого утверждения свидетельствует и значительная внутригрупповая дивергенция отдельных популяций. Так, в кластере, объединяющем животных горного типа, наиболее удаленными оказались популяции Mandala и Aylyg-Ou (рис. 1, 2), Irtys (рис. 1), а в группе овец степного типа – Despen, Sukpak, Alaak (рис. 1, 2) и Adargan (рис. 1).

При этом наибольшие дифференциация и генетическое разнообразие свойственны, прежде всего, овцам степного типа, причем внутригрупповые генетические различия между отдельными популяциями тувинской короткожирнохвостой овцы зачастую превышают межпородные (рис. 1, 2).

И все же, несмотря на сложную полиморфную генетическую структуру тувинской овцы, основную трудность представляет интерпретация данных по межпородной дифференциации.

Так, согласно дендрограммам, представленным на рис. 1 и 2 можно видеть, что цыгайская полутонкорунная овца значительно дистанцируется от грубошерстных овец (аборигенные курдючные и северокавказские породы), сближаясь с тонкорунными и полутонкорунными породами. Такое положение можно объяснить, с одной стороны, ее малоазиатским происхождением, а с другой, родством с мериносовыми овцами.

Еще М.Ф. Иванов считал, что цыгайские овцы являются очень близкими к мериносовым, имеют с ними общие корни и происходят от тех же тонкошерстных овец, которых разводили на фригийских пастбищах в Малой Азии за 800–1000 лет до н. э. [23], а П.Н. Кулешов, автор породы новокавказский меринос, отмечал, что голова цыгайской овцы настолько похожа на мериносовых овец, что их сложно различить [24]. По данным турецких исследователей, в отличие от малоазиатских аборигенных пород цыгайская овца также попадала в общий кластер с европейскими мериносами [25], в то время как наблюдаемое нами обособление цыгайской овцы (рис. 1, 2) может быть связано с генетической

неоднородностью конкретной рассматриваемой выборки ( $H_o = 0.873$  и  $H_{E(u)} = 0.820$ ).

Наряду с цыгайской породой подобное изолированное положение занимает забайкальская тонкорунная овца – сложная синтетическая порода, в период выведения которой, в разные годы, использовалось до 12 различных пород [26]. Вероятнее всего, как и в случае с выборкой цыгайской овцы, именно генетическая неоднородность забайкальского мериноса ( $H_o = 0.891$  и  $H_{E(u)} = 0.807$ ) определила его расположение на ребре дендрограммы (рис. 1, 2).

В целом же (рис. 1, 2) хорошо видно, что отечественные породы кластеризуются на две большие группы, одна из которых объединяет тонкорунных и полутонкорунных овец, а другая – аборигенные грубошерстные породы северокавказского и азиатского происхождения. При этом обе группы также структурно неоднородны.

Например, на дендрограмме по  $F_{ST}$  (рис. 1) в небольшом кластере сгруппировались маньчжурский и советский мериносы с романовской породой, а на дендрограмме по Jost's  $D$  (рис. 2) – маньчжурская, советская и ставропольская тонкорунные породы.

Понятно, что романовская грубошерстная короткохвостая овца попадает в общий кластер с длиннохвостыми мериносами случайно (рис. 1), так как ни сама эта порода, ни другие североазиатские короткохвостые овцы никогда не участвовали в создании тонкорунных пород овец. Что же касается родства маньчжурского мериноса и ставропольской тонкорунной породы, то оно более чем очевидно, так как последняя непосредственно участвовала в его выведении [27]. Однако возникает другой вопрос, чем же обусловлено сближение маньчжурского и советского мериносов (рис. 1, 2), при получении которых не использовались общие родительские или прародительские формы. Причина генетического “выравнивания” этих пород, вероятно, кроется в последствиях так называемой “австрализации”, когда в течение нескольких десятков лет проводилось систематическое улучшающее скрещивание российских тонкорунных овец с австралийскими мериносами [20].

Следующий подкластер в большом кластере тонкорунных и полутонкорунных овец, выявляемый на дендрограмме по  $F_{ST}$  (рис. 1), объединил четыре тонкорунные и одну полутонкорунную

породы, грозненскую, сальскую, кулундинскую, ставропольскую и соответственно горноалтайскую. Родство грозненской, кулундинской и горноалтайской овец не вызывает сомнений, так как при их выведении использовались австралийские меринсы. К тому же грозненская порода являлась базовой при создании горноалтайских и кулундинских овец, а близость грозненской, сальской и ставропольской пород определяет присутствие в их родословной новокавказского камвольного меринса [28]. Продолжительное использование австралийских меринсов в качестве “улучшателей” для грозненской тонкорунной [29], сальской [30] и ставропольской пород овец только способствовало в дальнейшем их большему сближению.

В свою очередь, обнаруживаемая на дендрограмме по  $F_{ST}$  (рис. 1) некоторая дивергенция кулундинской овцы может являться отражением отдельных негативных процессов, происходящих в этой породе и проявляющихся в частичном вырождении хозяйственно полезных признаков и появлении у нее нетипичной белой окраски [31].

Согласно дендрограмме по Jost's  $D$  (рис. 2) в общий кластер группируются куйбышевская, романовская, сальская, кулундинская и грозненская породы с образованием двух подкластеров, в один из которых попадают уже описанные нами родственные или общие по происхождению тонкорунные овцы: сальская, кулундинская и грозненская, а второй объединяет никак не связанные между собой куйбышевскую и романовскую породы овец.

Следующий подкластер, обнаруживаемый на дендрограммах по  $F_{ST}$  и Jost's  $D$ , объединяет полутонкорунные породы: кучугуровскую, русскую длинношерстную и северокавказскую (рис. 1, 2). В эту же группу пород на дендрограмме по  $F_{ST}$  попадают куйбышевские овцы (рис. 1), близость которых к северокавказской породе обусловлена присутствием в родословной обеих пород британских овец ромни-марш, а родство русской длинношерстной и кучугуровской овец связано с тем, что последняя, полученная от скрещивания в конце XIX в. местных овец воронежской губернии с волошскими овцами [32], непосредственно участвовала в образовании русской длинношерстной овцы. Объединение северокавказской и русской длинношерстной овцы объясняется присутствием в обеих породах крови английских линкольнов [27].

В то же время группировка дагестанской горной и волгоградской пород овец (рис. 1) совершенно необъяснима. И хотя в рамках общего подкластера эти породы достаточно дифференцированы друг от друга, они никак не связаны между собой, чего не скажешь про родство волгоградских и горноалтайских овец (рис. 2). Известно, что на первых этапах выведения волгоградской тонкорунной породы местных грубошерстных курдючных маток скрещивали с мясо-шерстными баранами породы прекос [33], которых завозили и на Алтай, где они участвовали в выведении горноалтайской породы [34].

Что же касается грубошерстных длинножирнохвостых овец, то на дендрограмме по  $F_{ST}$  аборигенные северокавказские породы лезгинская, андийская и карачаевская группируются в один общий куст с некоторым обособлением карачаевских овец (рис. 1). На дендрограмме по Jost's  $D$  (рис. 2) к этой группе добавляется тушинская овца, а карачаевская порода еще больше дифференцируется. Подобное взаиморасположение аборигенных северокавказских пород во многом обосновано картографией районов их возникновения. В частности, Ахметский район Грузии (тушинская порода) граничит с Ботлихским (андийская порода) и Ахтынским (лезгинская порода) районами Дагестана, в то время как Карачай (карачаевская порода) – историческая территория формирования и проживания карачаевцев в верховьях р. Кубань в Карачаево-Черкесии находится на значительном удалении.

Происхождение местных овец Дагестана и, в частности, лезгинских и андийских пород пока не установлено. Известно только, что они создавались местным населением путем систематического и целенаправленного отбора и подбора муфлонообразных предков домашних овец. Позднее на их формирование могли оказать влияние местные породы, разводимые в Грузии и Азербайджане [35]. Действительно, в нашем случае тушинская порода образует общий кластер с андийской и лезгинской овцами, при одновременном дистанцировании друг от друга (рис. 2).

Кластер курдючных овец включает эдильбаевскую и калмыцкую породы (рис. 2). Эдильбаевские овцы были выведены во второй половине XIX в. народной селекцией в междуречье Волги и Урала, для чего отбирали лучших курдючных овец и затем скрещивали их с местными грубошерстными астраханскими баранами [27]. Калмыцкая курдючная порода овец была зарегистрирована

стрирована сравнительно недавно, в 2012 г., и в ее создании были задействованы местные калмыцкие и помесные калмыцко-эдильбаевские овцы, а также бараны торгудской породы [36]. Обе рассматриваемые породы (эдильбаевская и калмыцкая) тесно консолидированы (рис. 1, 2), что не исключает их общего происхождения от ойратских курдючных овец Западной Монголии.

В начале XVII в. часть ойратских племен ушла из Джунгарии (северная территория современного Синьцзян-Уйгурского автономного района Китая) в низовья Волги и составила население Калмыцкого ханства, в 1771 г. половина калмыков (в основном торгуты и хошеуты) вернулась на прежние кочевья. Естественно, что в процессе этих крупных переселений перегонялся скот, включая курдючных овец [37].

При этом каракульская овца, находясь с курдючными породами в одном кластере, несколько отдалается от них (рис. 1, 2) и этому тоже есть объяснение. Б.Н. Васин (1968) считал, что современная каракульская порода произошла в результате смешения двух (или нескольких) групп овец, из которых одна была курдючной с грубой шерстью, другая же относилась к полугрубошерстным афганским и курдским породам [38].

На представленных дендрограммах (рис. 1, 2) короткожирнохвостая местная бурятская порода буубэй занимает промежуточное положение между тувинскими короткожирнохвостыми и курдючными овцами, генеалогически сближаясь с последними, что не удивительно, если предположить их общемонгольское происхождение. Однако нельзя исключать и наблюдающийся в последние годы фактор бесконтрольных скрещиваний с бурятской грубошерстной породой овец, из-за чего произошла частичная утрата ее продуктивных качеств [39].

Проведенный в дальнейшем анализ генетической структуры (рис. 3) показывает при  $K = 2$  разделение популяций тувинской короткожирнохвостой овцы и других российских пород овец на два основных кластера, с последующей генетической дифференциацией тувинских овец при  $K = 3$  на два внутрипородных типа: горный и степной. Повышение уровня кластеризации ( $K=5$ ) приводит к тому, что у тувинской овцы выделяется самостоятельный кластер популяции Irtysh, а остальные российские породы начинают разделяться на две группы, одна из которых включает тонкорунные и полутонкорунные по-

роды, а вторая – грубошерстные аборигенные. В дальнейшем, от  $K = 6$  и выше отмечается следующая дифференциация тувинских популяций овец преимущественно степного внутривидового типа и при  $K = 8$  в группе тувинских овец популяция Desren формирует свой собственный кластер на фоне неопределенной перекрывающейся дифференциации отдельных российских пород.

Таким образом, по результатам адмикс-анализа, с одной стороны, подтверждается высокий уровень изоляции и генетической изменчивости тувинских овец, а с другой, – градиация отечественных пород овец на группу тонкорунных и полутонкорунных и группу грубошерстных.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Любое пороодообразование как процесс человеческой деятельности, не может рассматриваться вне культуры, истории и географии. В историко-этнографической перспективе тувинская культура обычно воспринимается как этнокультура тюркских племен, осевших в Засаянье в VI–VIII вв. н. э. [40]. Скорее всего, именно этот временной период и можно считать началом формирования тувинской короткожирнохвостой овцы, где одними из определяющих факторов отбора стали изоляция региона и значительная пестрота его почвенно-климатических условий.

В географическом разрезе Тува характеризуется как находящаяся в центре Азии, удаленная и труднодоступная страна [41], границы которой на западе, севере, востоке и юго-востоке проходят по высоким горным хребтам, а на юге – по приподнятым равнинам и средневысотным горам [42]. Как следствие, удаленность и обособленность региона обусловили генетическую изолированность тувинских овец.

С другой стороны, сложный рельеф и контрастный климатический режим территории определяют большое разнообразие и пространственную неоднородность почвенного покрова Тувы [43], что при разном уровне кормообеспечения пастбищ создает условия для формирования генетической неоднородности тувинской короткожирнохвостой породы при относительном внешнем сходстве ее внутривидовых типов.

Однако сложная внутривидовая дифференциация свойственна не только тувинской овце, но и некоторым другим аборигенным породам.

Так, отдельные разновидности или отродья горных и предгорных овец при определенном сходстве имеют значительные различия, вызванные особенностями условий содержания и разведения [44]. Например, карачаевская порода представлена тремя внутривидовыми типами: “кара-мююз”, “тумак” и “кекбаш” [45], которые различаются по живой массе, настригу и качеству шерсти [46].

Еще большим разнообразием характеризуется каракульская овца, в структуре генофонда которой выделяют многочисленные эколого-географические, внутривидовые, шерстно-конституциональные, продуктивные и заводские типы [47]. Подтверждением вышесказанному могут служить значительные генетические расхождения, выявляемые между каракульскими овцами на территории республик бывшего СССР [48].

В настоящей работе при ранжировании объектов основной акцент был сделан на использовании Neighbor-Net кластеризации, в этом случае для оценки генетической дифференциации чаще всего применяют индекс фиксации –  $F_{ST}$ . Однако при анализе STR-маркеров уровень гетерозиготности популяций оказывает негативное влияние на его значения. В качестве альтернативы Л. Джостом была предложена мера генетической дистанции Jost's  $D$ , базирующаяся на изменчивости эффективного числа аллелей [14].

Согласно нашим данным хорошо видно, что в отличие от дендрограммы по  $F_{ST}$  кластеризация по Jost's  $D$  существенно “улучшает” дифференциацию неродственных между собой пород, например дагестанской горной и карачаевской. Также очевидна группировка тушинской овцы с территориально близкими ей северокавказскими аборигенными породами.

В связи с выявляемыми “разночтениями” интерес представляет сравнение полученных нами данных по STR-маркерам с ранее проведенным SNP-анализом, выполненным с привлечением тех же самых пород овец [9].

На первый взгляд кластеризация пород по данным SNP-генотипирования выглядит более структурированной, причем системность в дифференциации пород усиливается при дополнительном включении в анализ овец мирового породного генофонда. Прежде всего это хорошо видно на примере таких “сложных случаев”, как кластеризация романовской по-

роды, которая по результатам SNP-маркирования попадает в группу овец Северной Европы. Действительно, на происхождение романовской породы от северных короткохвостых овец указывали еще М.Е. Лобашев, П.Н. Кулешов и М.Ф. Иванов. Это утверждение подтверждают и краниологические исследования, проведенные в 1916 г. Н.П. Чирвинским и В.Б. Елагиным, и сравнительно небольшой размер романовских овец относительно других пород [49]. Также по результатам SNP-анализа вполне обосновано объединение в общий кластер родственных горноалтайской и цигайской пород и обособление волгоградской тонкорунной породы [9], сложное происхождение которой, как результат скрещивания нескольких пород разного направления продуктивности, обуславливает разнотипичность ее генофонда [50].

В то же время при SNP-маркировании Neighbor-Net кластеризация по  $F_{ST}$  “игнорирует” генетическую общность русской длинношерстной овцы с кучугуровской породой, которая значительно отдалается от нее, одновременно сближаясь с неродственными ей полутонкорунными цигайскими и горноалтайскими овцами. Иными словами, кластеризация, проводимая по данным SNP-анализа, успешно решая проблему дифференциации сложных синтетических пород, в отличие от STR-маркирования не учитывает более тонкие межпородные генетические взаимосвязи на уровне близкородственных групп [14], что создает предпосылки для взаимного методологического дополнения SNP- и STR-маркирования.

Подводя общий итог работе, можно отметить, что обнаруживаемый высокий уровень генетического полиморфизма внутривидовых типов тувинской короткожирнохвостой овцы является показателем экологической пластичности породы и следствием ее приспособляемости к изменениям окружающей среды, а генетическая изоляция популяций тувинских овец определяется географической обособленностью региона.

По результатам межпородной дифференциации основным фактором сближения тонкорунных пород овец является их “австрализация” (вводные и улучшающие скрещивания с австралийским мериносом), а объединение тонкорунных и полутонкорунных пород обусловлено влиянием новокавказского камвольного мериноса, выступающего общей предковой формой для подавляющего большинства российских пород овец



- водства. М.: Росагропромиздат. 1989. 175 с.
3. *Столповский Ю.А., Шумиит Л.В., Кол Н.В., и др.* Анализ генетической изменчивости и филогенетических связей у популяций тувинской короткожирнохвостой овцы с использованием ISSR-маркеров // С.-х. биология. 2009. № 6. С. 34–43.
  4. *Бекетов С.В., Коноров Е.А., Пискунов А.К. и др.* Популяционно-генетическая характеристика тувинских короткожирнохвостых овец // Генетика. 2022. Т. 58. № 3. С. 332–342.
  5. Государственный племенной регистр, 2023 <http://opendata.mcx.ru/opendata/7708075454-plemennyuregistr>.
  6. *Нестерук Л.В.* Генетический полиморфизм романовской породы овец: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. М.: ИОГен РАН, 2016. 22 с.
  7. *Zinovieva N.A., Selionova M.I., Gladyr E.A. et al.* Investigation of gene pool and genealogical links between sheep breeds of southern Russia by blood groups and DNA microsatellites // Genetika. 2015. V. 47. P. 395–404.
  8. *Денискова Т.Е., Селионова М.И., Гладырь Е.А. и др.* Изменчивость микросателлитов в породах овец, разводимых в России // С.-х. биология. 2016. Т. 51. № 6. С. 801–810. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.6.801rus>
  9. *Deniskova T.E., Dotsev A.V., Selionova M.I. et al.* Population structure and genetic diversity of 25 Russian sheep breeds based on whole-genome genotyping // Genet. Sel. Evol. 2018. V. 50. №. 29. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0399-5>
  10. *Денискова Т.Е., Доцев А.В., Зиновьева Н.А.* Характеристика современного генофонда российских пород овец на основе применения ДНК-чипов высокой плотности // Материалы науч. конф. с междун. участием “Генетические процессы в популяциях”. М.: ИОГен РАН, 2022. С. 24.
  11. *Deniskova T., Esmailzadeh A., Dotsev A. et al.* A search for Eurasian sheep relationships: Genomic assessment of the autochthonous sheep breeds in Russia and the Persian plateau // Diversity. 2022. V. 14. № 6. P. 445. <https://doi.org/10.3390/d14060445>
  12. *Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Доцев А.В., Зиновьева Н.А.* Гаплотипическое разнообразие российских пород овец // Сборник научных трудов КНЦЗВ. 2022. Т. 11. № 1. <https://doi.org/10.48612/sbornik-2022-1-74>
  13. *Olschewsky A., Hinrichs D.* An overview of the use of genotyping techniques for assessing genetic diversity in local farm animal breeds // Animals. 2021. V. 11. № 7. <https://doi.org/10.3390/ani11072016>.
  14. *Кузнецов В.М.* Сравнение методов оценки генетической дифференциации популяций по микросателлитным маркерам // Зоотехния. 2020. С. 169–182. <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.2.169-182>.
  15. *Huson D.H., Bryant D.* Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. № 2. P. 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
  16. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2018. <https://www.R-project.org>.
  17. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
  18. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
  19. *Keenan K., McGinnity P., Cross T.F. et al.* DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // Methods Ecol. Evol. 2013. № 4. P. 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
  20. *Абонеев В.В., Селькин И.И., Кулаков Б.С.* О породной структуре тонкорунного и полутонкорунного овцеводства // Сб. науч. трудов Ставропольского н.-и. ин-та животноводства и кормопроизводства, 2005. Т. 1. № 1. С. 16–20.
  21. *Марзанов Н.С., Амерханов Х.А., Фокеев В.С. и др.* Генетические особенности овец отечественных и зарубежных тонкорунных пород // С.-х. биология. 2012. № 2. С. 14–26.
  22. *Монгуш С.С.* Продуктивные качества тувинско-сараджинских полугрубошерстных овец // Материалы межд. научно-практ. конф. “Состояние, проблемы и перспективы развития овцеводства и козоводства в Российской Федерации”. Чита, 2018. С. 29–33.
  23. *Иванов М.Ф.* Овцеводство. М.: Сельхозгиз, 1935. 816 с.
  24. *Останчук П.С.* Породы овец в контексте исторического развития отрасли на Крымском полуострове // Аграрный вестник Урала. 2021. Т. 210. № 7. С. 75–86. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2021-210-07-75-86>
  25. *Akış I., Esen Gürsel F., Nacihasanoğlu Çakmak N. et al.* Polymorphisms of Cyp19 and Myostatin Genes in Turkish Indigenous Sheep Breeds // J. Hellenic Veterinary Med. Society. 2017. V. 68. P. 313–318.
  26. *Мурзина Т.В., Вершинин А.С., Дамдинова Л.Г.* Генетический потенциал забайкальской тонкорунной породы овец // Овцы, козы, шерстяное дело. 2016. № 1. С. 8–11.
  27. *Максимов Г.В., Иванова Н.В., Максимов А.Г.* По-

- роды овец и коз. Персиановский: Донской ГАУ, 2018. 182 с.
28. Словарь-справочник по животноводству. М.—Л.: Сельхозгиз, 1935. 612 с.
  29. Мороз В.А., Исмаилов И.С. К вопросу селекции овец грозненской породы // Вестник АПК Ставрополья. 2013. Т. 10. № 2. С. 72–75.
  30. Колосов Ю.А., Засемчук И.В., Широкова Н.В., Бакоев Н.Ф. Сальская порода овец – история развития и совершенствования // Сб. науч. трудов Ставропольского н.-и. ин-та животноводства и кормопроизводства. 2014. Т. 3. № 7. С. 84–87.
  31. Владимиров Н.И., Старожук С.И., Владимирова Н.Ю. Некоторые экстерьерно-конституциональные особенности овец кулундинской породы // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. 2003. № 2. С. 259–261.
  32. Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. Санкт-Петербург: ВНИИГРЖ, 1994. 469 с.
  33. Цырендондоков Н.Д. Создание новой породы волгоградских тонкорунных мясо-шерстных овец // Вопросы совершенствования племенной работы и технологий в животноводстве. М.: Московская ветеринарная академия, 1979. Т.104. С. 31–41.
  34. Подкорытов А.Т. Горное овцеводство: разведение, селекция, кормление, содержание, переработка, технология, экономика. Барнаул: Азбука, 2019. 818 с.
  35. Гаджиев З.К., Бобрышова Г.Т. Грубошерстные овцы Дагестана // Сб. науч. трудов Всеросс. н.-и. ин-та овцеводства и козоводства. 2017. Т. 2. № 10. С. 3–10.
  36. Юлдашбаев Ю.А., Арилов А.Н., Зулаев М.С., Гаряев Б.Е. Новая порода овец – калмыцкая курдючная // Изв. ТСХА. 2013. Вып. 3. С. 109–113.
  37. Очир А., Бакаева Э.П., Орлова К. В. Монгольские этнонимы: вопросы происхождения и этнического состава монгольских народов. Элиста: КИГИ РАН, 2016. 286 с.
  38. Васин Б. Н. Цветной каракуль. М.: Колос, 1968. 105 с.
  39. Митыпова Е.Н., Цыбикова Р.Н. Совершенствование овец аборигенной бурятской грубошерстной породы в направлении повышения продуктивности // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. Т. 147. № 1. 2017. С. 104–110.
  40. Маннай-оол М.Х. Тувинцы. Происхождение и формирование этноса. Новосибирск: Наука, 2004. 164 с.
  41. Попков Ю.В., Тюгашев Е.А. “Затерянный мир”: тувинская культура в центр-периферийной интерпретации геокультурного и социокультурного пространства // Новые исследования Тувы. 2022. № 1. С. 225–236. <https://doi.org/10.25178/nit.2022.1.15>
  42. Прокофьева Е.Д. Процесс национальной консолидации тувинцев. СПб.: Наука, 2011. 538 с.
  43. Дубровский Н.Г. Степные и залежные фитосистемы Тувы: Автореф. Дис. ... докт. биол. наук. Улан-Удэ: Бурятский гос. ун-т, 2007. 48 с.
  44. Потанина А.В. Овцеводство Дагестана и пути его дальнейшего улучшения. Махачкала. 1968. 468 с.
  45. Тамбиев Х.М. История и пути развития карачаевской породы овец. Черкесск: Изд. КНИИ, 2007. 222 с.
  46. Гаджиев З.К., Османова О.Р. Продуктивность овец карачаевской породы разных генотипов // Сб. науч. трудов Краснодарского науч. центра по зоотехнии и ветеринарии. 2014. С. 1–4.
  47. Елемесов К.Е. Руководство по каракулеводству. Алма-Ата: Кайнар, 1986. 219 с.
  48. Марзанов Н.С., Петров С.Н., Марзанова Л.К. и др. Генетические особенности и происхождение каракульской породы овец // Овцы, козы, шерстяное дело. 2014. № 4. С. 15–17.
  49. Лобков В.Ю., Белоногова А.Н., Арсеньев Д.Д. Биологические особенности овец романовской породы. Ярославль: Изд-во ФГБОУ ВПО “Ярославская ГСХА”, 2012. 162 с.
  50. Шайдуллин И.Н., Фейзуллаев Ф.Р., Кириллова Е.К. и др. Продуктивные качества овец волгоградской породы разных конституциональных типов // Сб. науч. трудов Ставропольского н.-и. ин-та животноводства и кормопроизводства. 2012. Т. 2. № 1. С. 102–107.
  51. Столповский Ю.А., Кузнецов С.Б., Солоднева Е.В., Шумов И.Д. Новая система генотипирования крупного рогатого скота на основе технологии ДНК-микрочипов // Генетика. 2022. Т. 58. № 8. С. 857–871.

**Populations of Tuvan Shot-Fat-Tailed Sheep  
in the Structure of the Gene Pool of Sheep Breeds  
of the Russian Federation**

**S. V. Beketov<sup>a, \*</sup>, T. E. Deniskova<sup>b</sup>, A. V. Dotsev<sup>b</sup>, E. A. Nikolaeva<sup>a</sup>, N. A. Zinovieva<sup>b</sup>,  
M. I. Selionova<sup>c</sup>, Yu. A. Stolpovsky<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

<sup>b</sup>*Federal Research Center for Livestock – VIZh named after academician L.K. Ernst, Moscow, 142132 Russia*

<sup>c</sup>*Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127550 Russia*

*\*e-mail: svbeketov@gmail.com*

Using 11 microsatellite markers (OarCP49, INRA063, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB11, INRA005, SPS113, INRA23, MAF65, McM527), data were obtained on the levels of variability and degree of differentiation of 24 populations (1140 samples) of the Tuvan coarse-haired short-fat-tailed sheep of different regions of the Republic of Tyva and 24 breeds of sheep (721 samples) of various origins, covering the main sheep-breeding regions of the Russian Federation. During the analysis, a high level of genetic isolation and variability of Tuvan sheep was found, and in the general structure of Russian sheep breeds, a pronounced genetic divergence was revealed into two large groups, one of which unites fine-fleeced and semi-fine-fleeced sheep, and the other indigenous coarse-wooled breeds of North Caucasian and Asian origin

**Keywords:** Tuvan sheep, russian sheep breeds, microsatellites, genetic variability, phylogeny, cultural and indigenous breeds.

УДК 631.523.5

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ДОМЕСТИЦИРОВАННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ (*Rangifer tarandus*) СРЕДНЕСИБИРСКОГО ПЛОСКОГОРЬЯ И ПРИЛЕГАЮЩИХ ТЕРРИТОРИЙ

С. Н. Каштанов<sup>1,\*</sup>, Е. С. Захаров<sup>2,3</sup>, М. Т. Семина<sup>1</sup>, Н. В. Винокуров<sup>4</sup>, А. В. Винокуров<sup>5</sup>,  
А. А. Онохов<sup>1</sup>, П. А. Филимонов<sup>1</sup>, Э.А. Николаева<sup>1</sup>, А. А. Южаков<sup>6</sup>, О. К. Сергеева<sup>5</sup>,  
М. М. Сомова<sup>1</sup>, К. А. Лайшев<sup>1,6</sup>, Ю. А. Столповский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, 677000 Россия

<sup>3</sup>Институт естественных наук, Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677000 Россия

<sup>4</sup>Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М. Г. Сафронова, Якутск, 677001 Россия

<sup>5</sup>Оленёкский историко-этнографический музей народов Севера, Республика Саха, с. Оленёк, 678480 Россия

<sup>6</sup>Научно-исследовательский институт сельского хозяйства и экологии Арктики – филиал Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Норильск, 663302 Россия

<sup>6</sup>Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199178 Россия

\*e-mail: snkashtanov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.05.2023 г.

После доработки 02.08.2023 г.

Принята к публикации 22.08.2023 г.

На основе 16 микросателлитных маркеров исследовалась генетическая структура доместичированного северного оленя двух пород – эвенкийской и эвенской, разводимых на территории Среднесибирского плоскогорья и прилегающих территорий. Анализировались генетические потоки между современными доместичированными популяциями северных оленей этих пород. Найдены значительные различия между эвенкийской таежной и эвенской породами домашних оленей. С помощью исторической выборки середины прошлого века выявлена высокая степень устойчивости во времени генофонда доместичированных популяций. Установлено, что генетические потоки между дикими и доместичированными формами на исследуемой территории незначительны. Показаны статистически значимые генетические различия между дикими и доместичированными популяциями северных оленей.

**Ключевые слова:** *Rangifer tarandus*, микросателлиты, STR-маркеры, пространственно-генетическая структура популяций.

**DOI:** 10.31857/S0016675824010076

Популяции дикого северного оленя *Rangifer tarandus* обитают в арктической и субарктической зонах Евразии и Северной Америки. Северный олень – мигрирующий вид, благодаря чему лишайниковый покров, являющийся основной пищей северных оленей в зимний период, не уничтожается полностью и успевает восстановиться. На большей части ареала домашние олени совместно обитают с дикими, известны многочисленные случаи миграций домашних оленей в стада диких как на Евразийской части ареала, так и в Северной Америке [1, 2]. Основная цель исследования – определение интенсивности генных потоков между популяциями диких и доместичированных северных оленей.

В процессе доместикации и последующего направленного отбора создано несколько пород северных оленей [3]. На севере Западной Сибири распространена ненецкая порода северных оленей; проведенные ранее исследования популяций обитающих на значительных графических расстояниях, показали низкий уровень генетической дифференциации популяций этой породы [4]. Далее на восток распространены эвенкийская и эвенская породы, определение генетического профиля этих пород и оценка уровня дифференциации между ними также была задачей настоящего исследования.

Для выявления современной генетической структуры доместичированных популяций

северного оленя исследуемого региона Сибири нами исследованы четыре выборки из центральной части Среднесибирского плоскогорья: “Сурудинский” (правобережье р. Лены), “Ючюгейское” (северная часть региона), “Анабар” и выборка Яна-Индибирской низменности “Таба-Яна” (рис. 1).

В Эвенкийском автономном округе находится единственный в стране племенной завод эвенкийской таежной породы северных оленей “Сурудинский”, где разводят таежный экотип этой породы. Особенность среды обитания и хозяйственное использование оленей в разных районах округа привели к созданию своеобразной популяции домашних северных оленей, отличающихся от других не только крупным размером, особенностями роста и развития, но также выносливостью. Олени этой породы используются и как транспортное животное [5]. Кроме этого, особое место в эвенкийском оленеводстве занимают мясная, пантовая и молочная продуктивность.

Следующая порода — эвенская, которую разводят в горно-таежных районах Якутии. Популяции этой породы отличаются относительно короткими маршрутами сезонных миграций. Основное поголовье домашнего северного оленя этой породы сосредоточено в двух районах республики: Усть-Янском (31533 особей) — выборка “Таба-Яна”, и Анабарском (23305 особей) — выборка “Анабар”. Между оленеводческими хозяйствами северного оленя эвенской породы существует обмен производителями, сравнительно много домашних оленей отправлялось из Оймяконского р-на, хозяйство Ючюгейское (выборка “Ючюгейское”) в другие районы, в том числе и перечисленные выше. В качестве внешней группы для оценки уровня различий генетической структуры domesticированных популяций оленей, разделенных значительными географическими расстояниями, использовали выборку из дикой популяции п-ва Таймыр (выборка “Таймыр”). Кроме этого, для оценки изменений генетической структуры во времени в исследование включена историческая выборка из популяции середины прошлого века “Оленёк”. Биологический материал получен из музейного ожерелья — обрезанных частей ушей (рис. 2).

Общий объем собранного материала составил 229 образцов, собранных с 2009 по 2023 гг. (табл. 1). Аллельная изменчивость исследуе-

мых популяций оценивалась с помощью панели 16 микросателлитных локусов, разработанной нами ранее [6]. Обработка данных микросателлитного анализа выполнялась в программной среде R [7]. Основные популяционно-генетические показатели вычислены с помощью R-пакета Diversity [8]. Тест на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (*HWE*) для каждой комбинации “выборка–локус” выполнен с использованием поправки Бонферрони, где номинальный уровень значимости  $\alpha = (0.05/96) = 5.2 \times 10^{-4}$ . Поиск собственных аллелей (private allele) осуществляли с помощью пакета PopGenReport [9]. Дифференциация исследуемых выборок оценивалась на основе попарных значений коэффициентов дифференциации *D* [10] и соответствующих им значений *p* (*p*-values), рассчитанных с помощью пакета DEMETics [11].

При анализе аллельного разнообразия исследуемых популяций выявлено 179 аллелей, среднее число аллелей на локус составило 11.2. Выборка из популяции диких оленей “Таймыр” характеризуется максимальными значениями аллельного богатства (*Ar*) 7.28 аллеля, наблюдаемой гетерозиготности (0.77), доли общих аллелей (83.74%) и количества приват-аллелей (30 аллелей). При этом пять приват-аллелей обнаружено в выборке “Сурудинский” и по одному аллелю в выборках “Анабар” и “Ючюгейское”. Наиболее низкими значениями показателей аллельного разнообразия отличаются выборки “Анабар” и “Ючюгейское” (табл. 1).

На втором этапе исследования рассматривалась парная генетическая дифференциация между четырьмя современными domesticированными популяциями оленей двух пород — эвенкийской и эвенской. Наименьшие среди исследованных выборок значение коэффициента дифференциации *D* (0.053) выявлено между выборками “Таба-Яна” и “Ючюгейское” — это две популяции эвенской породы, между ними практикуется обмен производителями. Максимальное значение (*D* = 0.098–0.145) между выборкой из популяции “Сурудинский” эвенкийской породы и тремя выборками эвенской породы (табл. 2). Это указывает на существенные межпородные различия, сложившиеся в ходе domesticации, отбора и процесса адаптации к конкретным природно-климатическим условиям.

Далее рассматривали уровень дифференциации между современными domesticированными

**Таблица 1.** Популяционно-генетические характеристики выборок северного оленя

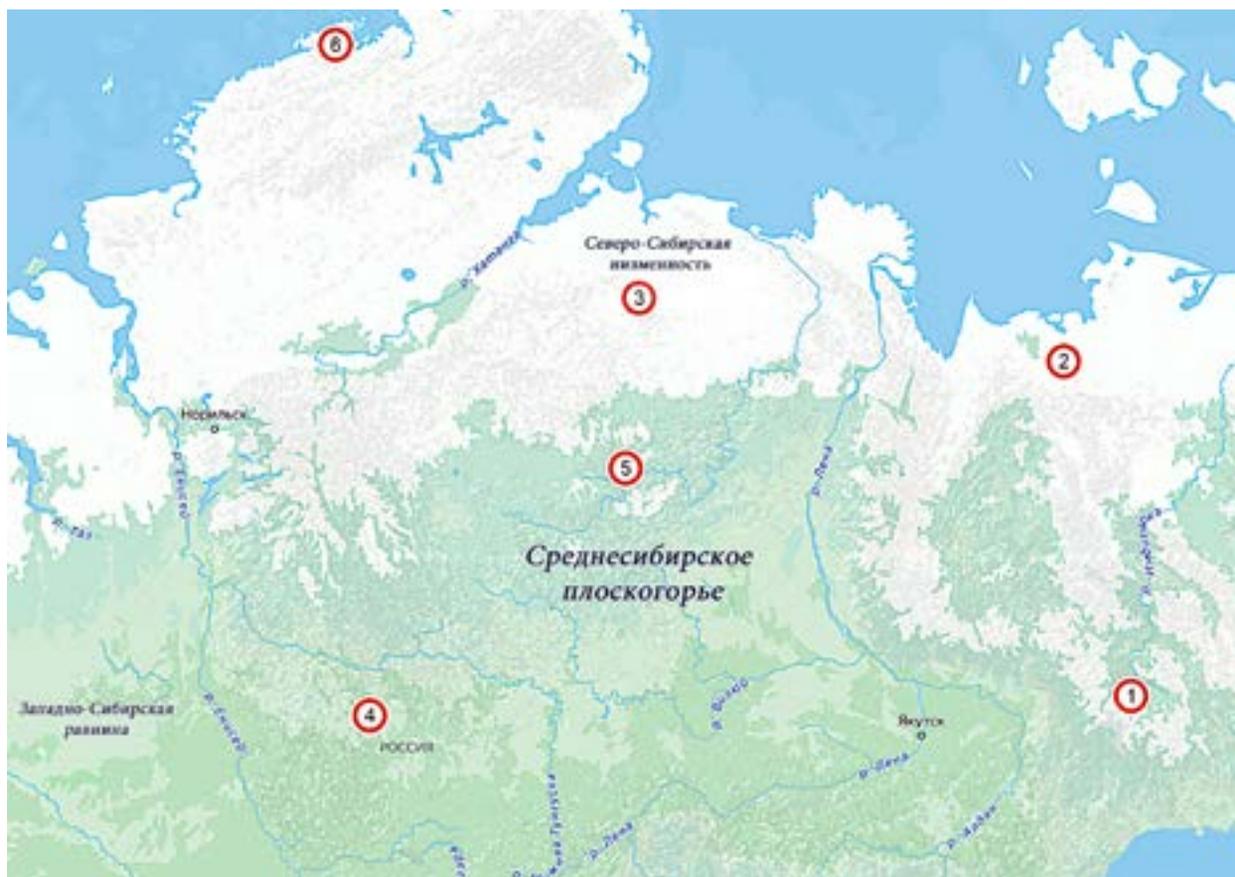
Выборки	<i>N</i>	<i>A</i>	%	<i>Ar</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>HWE</i>
“Ючюгейское”	40	102	60.17	5.42	0.7	0.69	0.753
“Таба-Яна”	22	104	63.87	5.64	0.7	0.69	0.515
“Анабар”	15	102	61.95	5.5	0.68	0.65	0.994
“Суриндинский”	99	130	76.57	5.95	0.69	0.68	0.895
“Оленёк”	31	105	64.08	5.54	0.68	0.68	<0.001
“Таймыр”	22	143	83.74	7.28	0.77	0.76	0.150

Примечание. *N* – число особей в выборке, *A* – количество аллелей на выборку, % – процент общих аллелей, *Ar* – аллельное богатство, усредненное по всем локусам; *Ho* и *He* – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности соответственно; *HWE* – уровень значимости для теста на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга.

**Таблица 2.** Парные значения коэффициентов дифференциации *D* между доместичированными и дикими популяциями северного оленя

	“Ючюгейское”	“Таба-Яна”	“Анабар”	“Суриндинский”	“Оленёк”	Таймыр
“Ючюгейское”		0.001	0.001	0.001	0.001	0,001
“Таба-Яна”	0.053		0.001	0.001	0.001	0,001
“Анабар”	0.082	0.071		0.001	0.001	0,001
“Суриндинский”	0.145*	0.098*	0.139*		0.001	0,001
“Оленёк”	0.098	0.078	0.145	0.133		0,001
“Таймыр”	0.239	0.190	0.259	0.207	0.206	

Примечание. Под диагональю – значения коэффициента дифференциации *D*, над диагональю – соответствующие им значения *p* (*p*-value); звездочкой отмечены межпородные значения коэффициента дифференциации *D*.

**Рис. 1.** Карта выборок из популяций доместичированных и диких оленей. 1 – “Ючюгейское”, 2 – “Таба-Яна”, 3 – “Анабар”, 4 – “Суриндинский”, 5 – “Оленёк”, 6 – “Таймыр”.

ми популяциями и двумя популяциями – дикой “Таймыр” и исторической “Оленёк”. Наиболее высокий уровень дифференциации установлен между выборкой “Таймыр” и выборками из доместичированных популяций. Максимальное значение  $D$  выявлено между выборками “Таймыр” и “Анабар” – 0.259 ( $p = 0.001$ ), минимальное 0.190 ( $p = 0.001$ ) с популяцией “Таба-Яна”. Необходимо отметить, что значения коэффициента  $D$  между дикой популяцией и доместичированными в несколько раз выше, чем между доместичированными популяциями из разных географических регионов.

При анализе дифференциации между выборкой “Оленёк” и современными доместичированными выборками наименьший уровень дифференциации обнаруживается с выборкой “Таба-Яна” (0.078). Это позволяет предположить, что историческая выборка “Оленёк” была собрана в северной части ареала северного оленя (см. рис. 1). Наиболее высокие значения ( $D$ ) отмечены между исторической выборкой “Оленёк” и выборкой “Анабар” – 0.145 ( $p = 0.001$ ).

Проведенное исследование позволило установить существование на исследуемой части ареала двух разных кластеров: диких и домашних оленей. Низкий уровень дифференциации популяции “Оленёк” с популяцией домашних оленей говорит о высокой устойчивости и сохранении генетической структуры доместичированной формы оленей во времени и пространстве, а высокое значение значения  $D = 0.206$  (“Оленёк” – “Таймыр”) подтверждает сделанные ранее выводы об отчетливой генетической дифференциации доместичированного и дикого оленя, которая сохранилась во времени [12].

Объяснение существования двух генетических кластеров диких и домашних оленей приведено на примере эвенской породы. Несмотря на близкое к равному соотношению домашних и диких оленей в Якутии (1 : 1.1) и значительное совпадение их пастбищных угодий массового пополнения диких популяций домашними животными не наблюдалось, в диких стадах домашние олени занимали не более 1–3%. Большинство домашних оленей, попавших в стада диких, обычно гибнет. Успешная гибридизация, вероятно, также редка вследствие низкой конкурентоспособности домашних самцов во время гона, вследствие сдвинутого периода отела домашних важенок в более ранний неблагоприятный период [13].



Рис. 2. Связка меток северного оленя (обрезанные части ушей).

Особый интерес представляет обособленное положение популяции “Анабар”, для нее установлены максимальные значения коэффициента как при сравнении с популяцией диких оленей Таймырского по-ва, так и при сравнении с исторической доместичированной популяцией “Оленёк” (табл. 2). При этом географические расстояния между выборками “Анабар” и “Таймыр” минимальны и составляют всего 720 км (при удаленности остальных выборок друг от друга на расстояние около 1400 км). Такое положение популяции “Анабар” может объясняться резким снижением численности домашних оленей в регионе и последующим восстановлением на рубеже XX–XXI вв. Современное поголовье домашнего северного оленя в Якутии насчитывает 168.7 тыс. голов, что ниже, чем в 1980-х гг. (329.1–377.9 тыс. голов) в 2–2.2 раза. Часть оленеводческих предприятий прекратила свое существование, часть стад была восстановлена или пополнена путем приобретения домашних оленей в других хозяйствах; в период с 2006 по 2009 гг. в разные районы Якутии произведена поставка 6476 оленей. Выявленная дифференциация домашних оленей выборки “Анабар”, вероятно, объясняется сохранением поголовья “в чистоте” в этот период, следовательно и миграции для восстановления численности были не нужны [14].

В процессе исследования удалось установить, что большая часть генетического разнообразия вида исследуемой части ареала сосредоточена в дикой популяции северного оленя Таймырского по-ва. Это выявлено как по общему количеству аллелей из (179 аллелей 143 выявлено у диких оленей выборки “Таймыр”), так и по числу собственных аллелей (30).

Особенности пространственно-генетической структуры вида исследуемой части ареала: генные потоки между популяциями диких и домашних оленей незначительны, взаимной интрогрессии между ними не происходит, а доместичированная форма характеризуется устойчивостью во времени по микросателлитным маркерам. Выявлены существенные межпородные различия в современных популяциях северных оленей. В целом в доместичированных популяциях оленей наблюдается снижение общего уровня генетического разнообразия, возможно, это последствия снижения численности и увеличения уровня изоляции.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-16-00062, а также в рамках Государственных заданий Минобрнауки РФ “Генетические технологии в биологии, медицине и сельском хозяйстве” – 122022600162-0; “Изучение генофондов сельскохозяйственных животных” (16.11.2016) – АААА-А16-116111610182-7 и “Разработка фундаментальных, методологических и технологических основ увеличения производства сельскохозяйственной продукции на Северо-Западе и в арктической зоне РФ, обеспечивающих продовольственную и экологическую безопасности регионов” – 122041900025-6.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баскин Л.М., Зайцев В.А. Барышева С.Л. Кадастр популяций диких и одичавших северных оленей (*Rangifer tarandus*) Сибири и Дальнего Востока. Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. Москва: Тов-во науч. изданий КМК. 2005. С. 168–184.
2. Kevin E. Colson, Karen H. Mager, Kris J. Hundertmark Reindeer introgression and the population genetics of caribou in Southwestern Alaska // *J. Heredity*. 2014. V. 105(5). P. 585–596. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu030>
3. Южаков А.А., Мухачев А.Д., Лайшев К.А. Породы и проблемы селекции северных оленей России М.: Наука, 2023. 165 с.
4. Семина М.Т., Каштанов С.Н., Бабаян О.В. и др. Анализ генетического разнообразия и популяционной структуры ненецкой аборигенной породы северных оленей на основе микросателлитных маркеров // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 8. С. 954–966. <https://doi.org/10.31857/S0016675822080069>
5. Гончаров В.В., Сергеева О.К. План селекционно-племенной работы с эвенкийской породой домашних северных оленей на 2019–2023 гг. // Метод. пособие НИИСХ и ЭА ФКНЦ СО РАН. Норильск, 2018. 104 с.
6. Столповский Ю.А., Бабаян О.В., Каштанов С.Н. и др. Генетическая оценка пород северного оленя (*Rangifer tarandus*) и их дикого предка с помощью новой панели STR-маркеров // *Генетика*. 2020. Т. 56. №12. С. 1409–1425. <https://doi.org/10.31857/S0016675820120139>.
7. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing. Austria, Vienna: 2014.
8. Keenan K., McGinnity Ph., Tom F.C. et al. DiveRcity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // *Meth. Ecol. Evol.* 2013. V. 4. P. 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
9. Adamack A.T., Gruber B. PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R // *Meth. Ecol. Evol.* 2014. V. 5. P. 384–387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
10. Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. № 18. P. 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
11. Jueterbock A., Kraemer P., Gerlach G. et al. Package ‘DEMEtics // *Mol. Ecol.* 2012. P. 3845–3852.
12. Шубин П.Н., Ефимцев Э.А. Биохимическая и популяционная генетика северного оленя. Л.: Наука, 1988. 102 с.
13. Сафронов В.М., Решетников И.С., Ахременко А.К. Северный олень Якутии: экология, морфология, использование. Новосибирск: Наука, 1999. 224 с.
14. Борисов В.Д., Борисова Т.Д. Особенности управления оленеводством в Республике Саха (Якутия) // *Пробл. совр. экономики*. 2017. № 3(63). С. 170–174.

## Genetic Structure of Domesticated Reindeer (*Rangifer tarandus*) Populations in the Central Siberian Plateau and Adjacent Areas

S. N. Kashtanov<sup>a,\*</sup>, E. S. Zakharov<sup>b, c</sup>, M. T. Semina<sup>a</sup>, N. V. Vinokurov<sup>d</sup>, A. V. Vinokurov<sup>c</sup>,  
A. A. Onokhov<sup>a</sup>, P. A. Filimonov<sup>a</sup>, E. A. Nikolaeva<sup>a</sup>, A. A. Yuzhakov<sup>g</sup>, O. K. Sergeeva<sup>f</sup>,  
M. M. Somova<sup>a</sup>, K. A. Layshev<sup>a, g</sup>, Yu. A. Stolpovsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Institute for Biological Problems of the Cryolithozone, Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677980 Russia

<sup>c</sup>Institute of Natural Science, Ammosov North-East Federal University, Yakutsk, 677000 Russia

<sup>d</sup>Saphronov Yakut Scientific Research Institute of Agriculture, Yakutsk, 677001 Russia

<sup>e</sup>Olenek Historical and Ethnographic Museum of the Peoples of the North, Sukha Republik, Olenek, 678480 Russia

<sup>f</sup>Research Institute of Agriculture and Ecology of the Arctic Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Norilsk, 663302 Russia

<sup>g</sup>St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199178 Russia

\*e-mail: snkashtanov@mail.ru

On the basis of 16 microsatellite markers, the genetic structure of the domesticated reindeer of two breeds, Evenk and Even, bred on the territory of the Central Siberian Plateau and adjacent territories, was studied. Genetic flows between modern domesticated reindeer populations of two breeds were analyzed. Significant differences were found between the Evenk taiga and Even breeds of domestic deer. Using a historical sample from the middle of the last century, a high degree of stability in time of the gene pool of domesticated populations was revealed. It has been established that genetic flows between wild and domesticated forms in the study area are insignificant. Statistically significant genetic differences between wild and domesticated reindeer populations are shown.

**Keywords:** *Rangifer tarandus*, microsatellites, STR markers, spatial genetic structure of populations.

УДК 577.21:616.895

## ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ РИСКА РАЗВИТИЯ ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИИ У РУССКИХ: ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ХРОМОСОМНОЙ ОБЛАСТИ 1q43

А. Э. Гареева<sup>1, 2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054, Россия

<sup>2</sup>Кемеровский государственный университет Минобрнауки России, Кемерово, 650000 Россия

<sup>3</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, 125993 Россия

\*e-mail: annagareeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.05.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Шизофрения является высоконаследуемым заболеванием. Генетический риск связан с большим количеством аллелей, включая распространенные аллели с малым эффектом, которые могут быть обнаружены в ходе полногеномных ассоциативных исследований. Цель настоящего исследования – изучение генетических факторов риска развития шизофрении при проведении полногеномного анализа ассоциации (GWAS) у русских из Республики Башкортостан. Исследованная выборка состояла из 320 больных параноидной шизофренией и 402 здоровых индивидов. Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе PsychChip, включавшим 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП).

**Ключевые слова:** генетика, шизофрения, полногеномный анализ ассоциаций, этническая принадлежность, этноспецифические маркеры, Республика Башкортостан, международный консорциум по психиатрической генетике PGC.

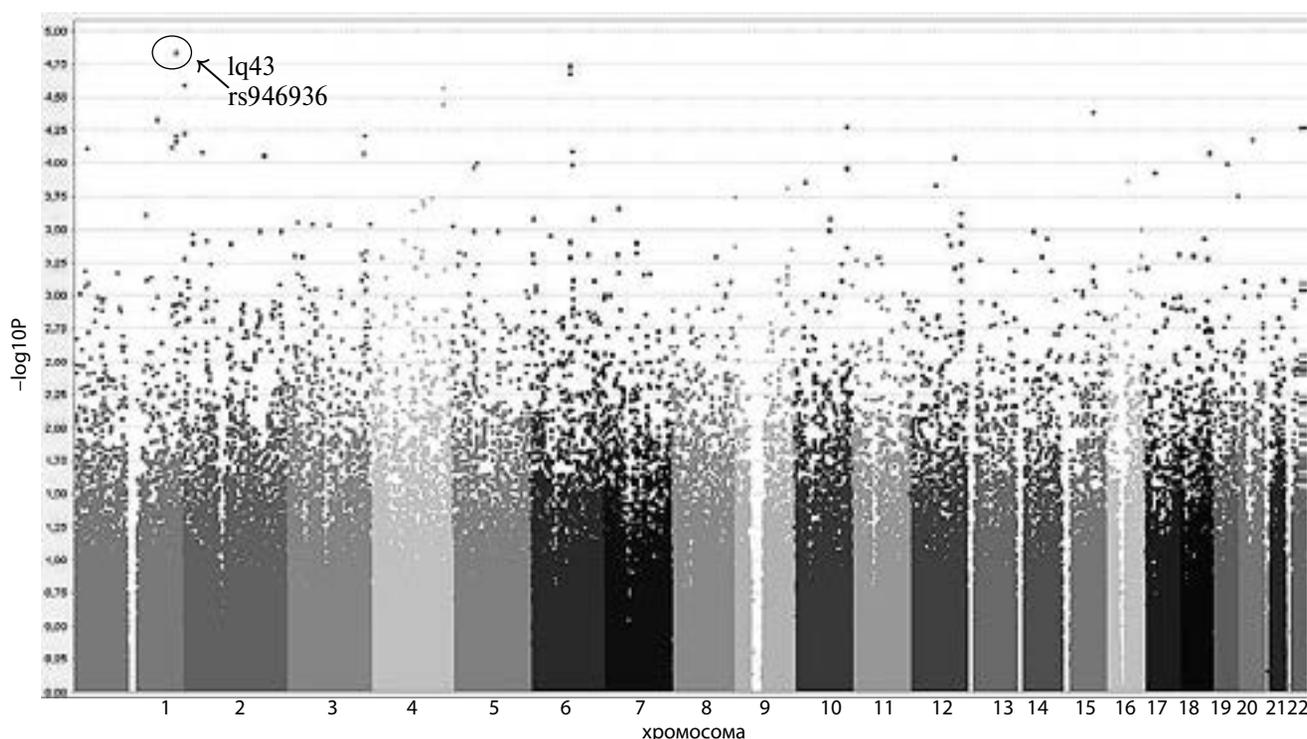
**DOI:** 10.31857/S0016675824010085

Шизофрения является сложным многофакторным заболеванием. Даже после многих лет научных исследований патогенез этого гетерогенного заболевания остается неясным. Известно, что при этом заболевании, происходит нарушение работы головного мозга, вероятно, вызванное взаимодействиями множества генов, на которые влияют факторы окружающей среды, приводящие к aberrантному развитию нервной системы и/или нейродегенерации [1]. Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) позволяют одновременно генотипировать несколько сотен тысяч полиморфных локусов генов, и находить каждый ген в геноме и подобно анализам сцепления, является методом свободным от гипотез, и таким образом способен идентифицировать гены, раскрывая еще неизвестные патогенетические механизмы, возможно, играющие важную роль в развитии шизофрении.

С целью выявления этноспецифических генетических факторов риска развития параноидной шизофрении нами проведен полногеномный анализ ассоциации у русских из Республики Башкортостан (рис. 1).

Объект исследования – 320 пациентов (173 мужчин, 147 женщин) русской этнической принадлежности с диагнозом параноидная шизофрения (ПШ) F20.0 согласно международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10), находящихся на лечении в Республиканской клинической психиатрической больнице № 1 Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. Средний возраст больных составил  $24.9 \pm 8.9$  лет. Средний возраст начала заболевания составил  $22.4 \pm 7.3$  лет. Информацию по этнической принадлежности до третьего поколения получали путем опроса. Контрольная группа, состояла из 402 здоровых индивидов той же этнической принадлежности и возрастной группы, не состоявших на учете у психиатра и нарколога и отрицавших у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям. Средний возраст здоровых доноров составил  $32.4 \pm 12.4$  года.

Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе Illumina Human 610-Quad PsychChip, включавшее 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов



**Рис. 1.** Графическое изображение результатов полногеномного анализа ассоциации 395832 ОНП с параноидной шизофренией у русских (Manhattan plot). На оси X указана хромосомная локализация ОНП, на оси Y – значения отрицательного десятичного логарифма уровня значимости  $p$ -value.

(ОНП). Полногеномный анализ ассоциации од- нонуклеотидных полиморфных локусов выпол- нен с помощью пакета программ PLINK 2.0 [2]. Подробное описание полногеномного анализа ассоциаций было опубликовано ранее [3].

Для снижения ошибки первого рода, была применена поправка FDR-BH (False Discovery Rate Benjamini-Hochberg) на число множествен- ных сравнений [4]. Полногеномный анализ ас- социации, выполненный у индивидов русской этнической принадлежности, выявил наиболее выраженные различия между больными ПШ и контрольной группой по полиморфным локу- сам, локализованным в области 1q43 (рис. 1). Наиболее высокий уровень ассоциации ПШ об- наружен с ОНП rs946936 ( $p = 1.42E-05$ ) (табл. 1). По данным проекта “1000 геномов”, частота встречаемости аллеля rs946936\*A в популяциях мира варьирует от 24.3% в индийской (GIN) до 51.6 % в китайской популяции (CDX) ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:236929581-236930581;v=rs946936;vdb=variation;vf=713358](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:236929581-236930581;v=rs946936;vdb=variation;vf=713358)).

Ближайшим кодирующим геном, распо- ложенным на расстоянии около 30 т. п. н. от дан- ного полиморфного локуса, является ген *MTR*

(1q43), кодирующий один из ключевых фермен- тов, участвующих в метаболизме гомоцистеина (ГЦ), метаболизирующего реметилизацию ГЦ в метионин-метионин синтазу (МС). В качестве кофактора в этой реакции принимает участие витамин В12. Высокий уровень активности *MTR* приводит к снижению гомоцистеина плазмы [1]. Ген *MTR* состоит из 33 экзонов, охватывающий около 123 т. п. н. геномной ДНК (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTR>). Целый ряд исследований демонстрирует изме- нение уровня гомоцистеина в плазме больных шизофренией и других психических заболева- ний [1, 5, 6].

Высокие уровни гомоцистеина могут увели- чивать внутриклеточную концентрацию свобод- ных радикалов, которые могут повреждать мем- браны нейронов и еще больше ухудшать работу головного мозга. Как член семейства витаминов группы В, фолиевая кислота участвует в мета- болизме ГЦ, и он проявляет мощную антиокси- дантную активность. Более того, дефицит фоли- евой кислоты и избыточный уровень ГЦ могут увеличивать внутриклеточный кальций. Нако- пленный кальций может способствовать произ- водству свободных радикалов и усугублять по- вреждение нервных клеток [6]. Антипсихотики

**Таблица 1.** Однонуклеотидные полиморфные варианты, локализованные в области 1q43 и ассоциированные с параноидной шизофренией у русских

Ген	№ rs	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1 больные, %	Частота аллеля 1 контроль, %	Аллель 2	<i>p</i>	<i>p<sub>fidr</sub></i>	OR
–	rs946936	g.237093381A>C	A	0.3516	0.245	C	1.42E-05	0.251	1.669
MTR	rs2853522	237061056A>C	A	0.3703	0.2706	C	6.11E-05	0.616	1.591
–	rs4351629	g.237077480G>T	G	0.3359	0.2388	T	6.67E-05	0.627	1.602
–	rs10802577	g.237126155C>T	C	0.2641	0.1903	T	0.001134	0.999	1.506
–	rs6428977	g.237083719A>G	A	0.3766	0.296	G	0.001301	0.999	1.442
MTR	rs10925257	g.92580A>G	G	0.2078	0.255	A	0.03421	0.999	0.762
MTR	rs1805087	g.94920A>G	G	0.2078	0.2537	A	0.03918	0.999	0.7673
–	rs1417303	g.237126385G>T	G	0.4078	0.3545	T	0.03929	0.999	1.252

**Таблица 2.** Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов в выборках больных параноидной шизофренией и в контрольных группах у русских

Генотип, аллель	Больные		Контроль		<i>p</i>	<i>p<sub>fidr</sub></i>	OR (CI95%)
	<i>n<sub>i</sub></i>	<i>p<sub>i</sub> ± s<sub>p</sub> CI (%)</i>	<i>n<sub>i</sub></i>	<i>p<sub>i</sub> ± s<sub>p</sub> CI (%)</i>			
rs946936							
A/A	38	11.88 ± 1.81 8.54–15.93	26	6.47 ± 1.23 4.27–9.33	0.011	0.999	OR = 1.95 (1.16–3.29)
A/C	149	46.56 ± 2.79 41–52.19	145	36.07 ± 2.4 31.37–40.98	4.4E–03	0.999	OR = 1.54 (1.14–2.08)
C/C	133	41.56 ± 2.75 36.11–47.18	231	57.46 ± 2.47 52.47–62.35	2.2E–05	0.999	OR = 0.53 (0.39–0.71)
A	225	35.16 ± 1.89 31.45–39	197	24.5 ± 1.52 21.57–27.63	1.42E–05	0.999	OR = 1.67 (1.33–2.1)
C	415	64.84 ± 1.89 61–68.55	607	75.5 ± 1.52 72.37–78.43	1.42E–05	0.999	OR = 0.6 (0.48–0.75)
rs2853522							
A/A	41	12.81 ± 1.87 9.35–16.98	31	7.73 ± 1.33 5.31–10.79	0.024	0.999	OR = 1.75 (1.07–2.86)
A/C	155	48.44 ± 2.79 42.84–54.06	155	38.65 ± 2.43 33.86–43.61	8.4E–03	0.999	OR = 1.49 (1.11–2.01)
C/C	124	38.75 ± 2.72 33.38–44.33	215	53.62 ± 2.49 48.6–58.58	7.1E–05	0.999	OR = 0.55 (0.41–0.74)
A	237	37.03 ± 1.91 33.28–40.9	217	27.06 ± 1.57 24.01–30.27	6.11E–05	0.999	OR = 1.59 (1.27–1.99)
C	403	62.97 ± 1.91 59.1–66.72	585	72.94 ± 1.57 69.73–75.99	6.11E–05	0.999	OR = 0.63 (0.5–0.79)
rs4351629							
G/G	35	10.94 ± 1.74 7.74–14.88	26	6.47 ± 1.23 4.27–9.33	0.032	0.999	OR = 1.78 (1.05–3.02)
G/T	145	45.31 ± 2.78 39.77–50.94	140	34.82 ± 2.38 30.17–39.71	4.2E–03	0.999	OR = 1.55 (1.15–2.09)
T/T	140	43.75 ± 2.77 38.24–49.38	236	58.71 ± 2.46 53.72–63.56	6.4E–05	0.999	OR = 0.55 (0.41–0.74)
G	215	33.59 ± 1.87 29.94–37.4	192	23.88 ± 1.5 20.97–26.98	6.67E–05	0.999	OR = 1.61 (1.28–2.03)
T	425	66.41 ± 1.87 62.6–70.06	612	76.12 ± 1.5 73.02–79.03	6.67E–05	0.999	OR = 0.62 (0.49–0.78)

могут значительно повышать уровни фолиевой кислоты и витамина В12, вызывая этим снижение уровня ГЦ в сыворотке, что в конечном итоге приводит к редукции симптомов шизофрении [7]. Интегрированное действие фолатного цикла и цикла метионина, необходимое для метаболизма ГЦ, также поддерживает метилирование и синтез нуклеотидов, что жизненно важно для поддержки эмбрионального роста, пролиферации и развития. Гипергомоцистеинемия связывают с негативным влиянием на эмбриональное развитие, включая дефект нервной трубки [8].

У больных параноидной шизофренией частота генотипа *rs946936\*A/A* была значительно выше, чем в контрольной группе индивидов (11.88 и 6.47%, соответственно) ( $p = 0.011$ , OR = 1.95, CI95% 1.16–3.29). Гетерозиготный генотип *rs946936\*A/C* также выявлялся у больных с более высокой частотой (46.56%), чем в контрольной группе (36.07%) ( $p = 4.4E-03$ , OR = 1.54, CI95% 1.14–2.08). Генотип *rs946936\*C/C* у больных встречался редко, в 41.56% случаев, а в контроле определялся чаще – в 57.46% случаев ( $p = 2.2E-05$ , OR = 0.53, CI95% 0.39–0.71). Однако после введения поправки на множественное сравнение для оценки доли ложноположительных результатов проведенной с помощью метода FDR-BH, различия по данным генотипам оказались статистически не значимы (*rs946936\*A/A*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs946936\*A/C*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs946936\*C/C*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ ) (табл. 2). Анализ распределения частот аллелей данного полиморфного локуса показал, что частота аллеля *rs946936\*A* у больных ПШ была выше (35.16%), чем в контроле (24.5%) ( $p = 1.42E-05$ ,  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , OR = 1.67, CI95% 1.33–2.1). Показатель отношения шансов для аллеля *rs946936\*C* составил 0.6 (CI95% 0.48–0.75) (табл. 2).

Выраженная ассоциация с развитием параноидной шизофрении также была установлена с однонуклеотидными полиморфными локусами *rs2853522* и *rs4351629*, расположенными в хромосомной области 1q43 (табл. 1). У больных параноидной шизофренией частота гомозиготного генотипа *rs2853522\*A/A* (12.81%) была значительно выше таковой в контрольной группе (7.73%) ( $p = 0.024$ , OR = 1.75, CI95% 1.04–2.97). Частота гетерозиготного генотипа *rs2853522\*A/C* (48.44%) у больных ПШ была также выше, чем у здоровых индивидов (38.65%) ( $p = 8.4E-03$ , OR = 1.49, CI95% 1.11–2.01). Генотип *rs2853522\*C/C* чаще встречался в контрольной группе индивидов – в 53.62%, чем у больных ПШ (38.75%) ( $p = 7.1E-05$ ; OR = 0.55 CI95% 0.40–0.75). При

введении поправки FDR-BH, уровни значимости оказались статистически не значимыми: *rs2853522\*A/A*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs2853522\*A/C*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs2853522\*C/C*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$  (табл. 2).

Частота аллеля *rs2853522\*A* у больных ПШ (37.03%) превышала его частоту в контрольной группе, где составила 27.06% ( $p = 6.11E-05$ ,  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , OR = 1.59, CI95% 1.27–1.99). Частота аллеля *rs2853522\*C* в группе здоровых индивидов была значительно выше (72.94%), чем у больных ПШ (62.97%) ( $p_{\text{fdr}} = 6.11E-05$ , OR = 0.63, CI95% 0.5–0.79) (табл. 2).

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs4351629* показал, что генотипы *rs4351629\*G/G* и *rs4351629\*G/T* у больных ПШ встречаются чаще (10.94 и 45.31%), чем у здоровых индивидов (6.47 и 34.83%): для генотипа *rs4351629\*G/G* –  $p = 0.032$ , OR = 1.78, CI95% 1.05–3.02; генотипа *rs4351629\*G/T* –  $p = 4.2E-03$ , OR = 1.15, CI95% 1.13–2.12. Генотип *rs4351629\*T/T* у больных определялся с частотой 43.75%, а в контрольной группе – с частотой 58.71% ( $p = 6.4E-05$ , OR = 0.55, CI95% 0.40–0.74). При введении поправки FDR-BH уровень значимости стал статистически не значимыми (*rs4351629\*G/G*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs4351629\*G/T*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs4351629\*T/T*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ ).

Аллели *rs4351629\*G* и *rs4351629\*T* у больных встречаются в 33.59 и 66.41% случаев соответственно по сравнению с 23.88 и 76.12% у здоровых индивидов. Показатель отношения шансов для аллеля *rs4351629\*G* составил 1.61 (CI95% 1.28–2.03),  $p = 6.67E-05$ ; для аллеля *rs4351629\*T* – 0.62 (CI95% 0.49–0.78). Поправка на множественное сравнение показала отсутствие статистически значимых различий (*rs4351629\*G*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs4351629\*T*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ ) (табл. 2).

В некоторых исследованиях сообщалось, что полиморфный вариант *rs1805087* (A2756G) гена *MTR* приводил к увеличению концентрации ГЦ у носителей аллеля *MTR\*A*. Так, была установлена ассоциация функционального полиморфного локуса *rs1805087* (A2756G) гена *MTR* с шизофренией [9, 10], депрессивными расстройствами у индусов [11], а также с синдромом Дауна в восточно-индийской популяции [12]. В ходе настоящего исследования ассоциации данным ОНП с шизофренией у русских не обнаружено (табл. 2).

В результате целого ряда исследований была установлена ассоциация ОНП генов, локали-

зованных в хромосомной области 1q43 с шизофренией, другими психическими и нейродегенеративными заболеваниями [14–17]. В исследовании, проведенном у норвежцев и исландцев, ни один из ОНП не достиг полногеномного уровня значимости, однако был выявлен ряд полиморфных локусов с достаточно высоким уровнем значимости, в том числе показана ассоциация ОНП rs6679053 гена фосфолипазы D5 – *PLD5* (1q43) – с развитием шизофрении [13]. Исследование GWAS M. Hamshere с соавт. с использованием выборки CLOZUK [14], состоящей из больных шизофренией, принимающих клозапин, была установлена ассоциация трех полиморфных локусов с развитием шизофрении, один из которых – rs6703335 гена серологически определяемого антигена рака толстой кишки 8 – *SDCCAG8* 1q43. Известно, что кодируемый данным геном белок может быть вовлечен в организацию centrosомы во время интерфазы и митоза. Мутации в этом гене связаны с нефро-ретикулярным синдромом  $p = 4.22E-08$  [14]. Последующее GWAS также выявило ассоциацию хромосомной области 1q43 (rs6703335 *SDCCAG8*) с развитием шизофрении в европейских популяциях [15]. Полногеномный анализ ассоциации с риском развития шизофрении у 2111 больных и 2535 индивидов, шведов по этнической принадлежности, выявил ассоциацию гена регулирующего сигнальную активность G-белка *RGS7* 1q43 (rs984402,  $p = 3.43E-07$ , OR = 0.79) с полногеномным уровнем значимости [16]. Кроме того, по данным ряда полногеномных исследований хромосомная область 1q43 сцеплена с рассеянным склерозом – нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся нарушением процессов миелинизации в ЦНС [17].

Таким образом, проведенный в настоящем исследовании полногеномный анализ показал отсутствие ассоциации параноидной шизофрении у русских с ОНП rs946936, расположенного в области 1q43, в непосредственной близости к гену *MTR*. В то время как многие литературные данные показали ассоциацию хромосомной области 1q43 с развитием шизофрении в различных популяциях, результаты настоящей работы можно объяснить как недостаточной численностью выборки для подобного рода исследований, так и межпопуляционными различиями в формировании наследственной предрасположенности к параноидной шизофрении.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим

стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Автор выражает огромную благодарность сотрудникам Департамента психиатрической медицины и клинических нейронаук Кардиффского университета г. Кардифф (Великобритания) М. О'Donovan, V. Escott-Price, M. Owen, G. Leonenko за советы по генерации и анализу данных, а также за участие в проекте. Особая благодарность директору ИБГ УФИЦ РАН проф. Э.К. Хуснутдиновой за научное консультирование.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mehta N., Jena I., Ray S. et al. Plasma homocysteine, serum vitamin B12 and folic acid status in newly detected schizophrenic patients of Eastern India // *Biomedicine*. 2023. V. 43. № 2. P. 587–589. <https://doi.org/10.51248/v43i02.2370>
2. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
3. Гареева А.Э. Полногеномное ассоциативное исследование риска развития шизофрении в Республике Башкортостан // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 8. С. 954–963. <https://doi.org/10.31857/S0016675823080076>
4. Benjamini Y., Drai D., Elmer G. et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. № 1–2. P. 279–284. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2)
5. Yu J., Xue R., Wang Q. et al. The effects of plasma homocysteine level on the risk of three major psychiatric disorders: A mendelian randomization study // *Front. Psychiatry*. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.841429>
6. Jia R., Yuan X., Zhang X. et al. Oxidative stress impairs cognitive function by affecting hippocampal fimbria volume in drug-naïve, first-episode schizophrenia // *Front. Neurosci.* 2023 V. 17. P. 1153439. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1153439>
7. Hasnat F., Dewan Z. F., Misbahuddin M. et al. Folic acid, vitamin B12 and homocysteine levels following olanzapine administration in schizophrenia patients // *Bangabandhu Sheikh Mu-*

- jib Med. Univ. J. 2018. V. 11. № 1. P. 11–16. <https://doi.org/10.3329/bsmmuj.v11i1.34950>
8. *D'Souza S.W., Glazier J.D.* Homocysteine metabolism in pregnancy and developmental impacts // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 802285. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.802285>
  9. *Kempisty B., Sikora J., Lianeri M. et al.* MTHFD 1958G>A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia // *Psychiatr. Genet.* 2007. V. 17. P. 3. P. 177–181. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e328029826f>
  10. *Roffman J.L., Brohawn D.G., Nitenson A.Z. et al.* Genetic variation throughout the folate metabolic pathway influences negative symptom severity in schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 2013. V. 39. № 2. P. 330–338. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbr150>
  11. *Dahal S., Longkumer I., Bhattacharjee D., Devi N.K.* Association of CBS 844ins68, MTR A2756G and MTRR A66G gene polymorphisms with depression: A population-based study from North India // *Gene Reports.* 2023. V. 30. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101714>
  12. *Chatterjee M., Saha T., Maitra S. et al.* Folate system gene variant rs1801394 66A>G may have a causal role in down syndrome in the Eastern Indian population // *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2020. V. 9. № 3. P. 215–224. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.9.3.215>
  13. *Djurovic S., Gustafsson O., Mattingsdal M. et al.* A genome-wide association study of bipolar disorder in Norwegian individuals, followed by replication in Icelandic sample // *J. Affect. Disord.* 2010. V. 126. № 1–2. P. 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.04.007>
  14. *Hamshere M.L., Walters J.T., Smith R. et al.* Genome-wide significant associations in schizophrenia to ITIH3/4, CACNA1C and SDCCAG8, and extensive replication of associations reported by the Schizophrenia PGC // *Mol. Psychiatry.* 2013. V. 6. P. 708–712. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.67>
  15. *Ripke S., O'Dushlaine C., Chambert K. et al.* Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 10. P. 1150–1159. <https://doi.org/10.1038/ng.2742>
  16. *Bergen S.E., Petryshen T.L.* Genome-wide association studies of schizophrenia: Does bigger lead to better results // *Curr. Opin. Psychiatry.* 2012. V. 25. № 2. P. 76–82. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835035dd>
  17. *McCauley J.L., Zuvich R.L., Bradford Y. et al.* Follow-up examination of linkage and association to chromosome 1q43 in multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2009. V. 10. № 7. P. 624–630. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.53>

## Genome-Wide Analysis of the Risk Association for the Development of Paranoid Schizophrenia in Russians: Search for Genetic Markers in the 1q43 Chromosomal Region

A. E. Gareeva<sup>1, 2, 3\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. Ufa, 450054*

<sup>2</sup>*Kemerovo State University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Kemerovo, 650000*

<sup>3</sup>*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Moscow, 125993*

\*e-mail: [annagareeva@yandex.ru](mailto:annagareeva@yandex.ru)

Schizophrenia is a highly hereditary disorder. Genetic risk is associated with a large number of alleles, including common alleles with little effect that can be found in genome-wide association studies. The aim of this study was to study genetic risk factors for the development of schizophrenia in a genome-wide association analysis (GWAS) in Russians from the Republic of Bashkortostan. The studied sample consisted of 320 patients with paranoid schizophrenia and 402 healthy individuals. GWAS genotyping of DNA samples was carried out on the PsychChip biochip, which included 610,000 single nucleotide polymorphic variants (SNPs).

**Keywords:** genetics, schizophrenia, genome-wide association analysis, ethnicity, ethnospecific markers, Republic of Bashkortostan, international consortium on psychiatric genetics (PGC).

УДК 577.21:616.895

## НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РИСКА ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИИ В ХРОМОСОМНОЙ ОБЛАСТИ 9q21.13 У ТАТАР: ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ

А. Э. Гареева<sup>1, 2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Кемеровский государственный университет Минобрнауки России, Кемерово, 650000 Россия

<sup>3</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, 125993 Россия

\*e-mail: annagareeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 11.07.2023 г.

Шизофрения – наиболее распространенное тяжелое психическое заболевание, приводящее к серьезному снижению высших функций, главным образом к изменению когнитивных функций и восприятию реальности. В его патогенезе участвуют как генетические факторы, так и факторы окружающей среды, однако его генетическая основа все еще нуждается в изучении. Цель исследования – выявление генетических маркеров параноидной шизофрении у татар из Республики Башкортостан. Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе PsychChip, включавшим 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП). Исследованная выборка состояла из 357 больных параноидной шизофренией и 383 здоровых индивидов татарской этнической принадлежности. В результате проведенного исследования впервые установлена ассоциация ОМП rs12376586 гена *MAMDC2*, расположенного в области 9q21.13, с развитием параноидной шизофрении у татар, проживающих в Республике Башкортостан.

**Ключевые слова:** генетика, шизофрения, полногеномный анализ ассоциаций, этническая принадлежность, этноспецифические маркеры, Республика Башкортостан, международный консорциум по психиатрической генетике PGC.

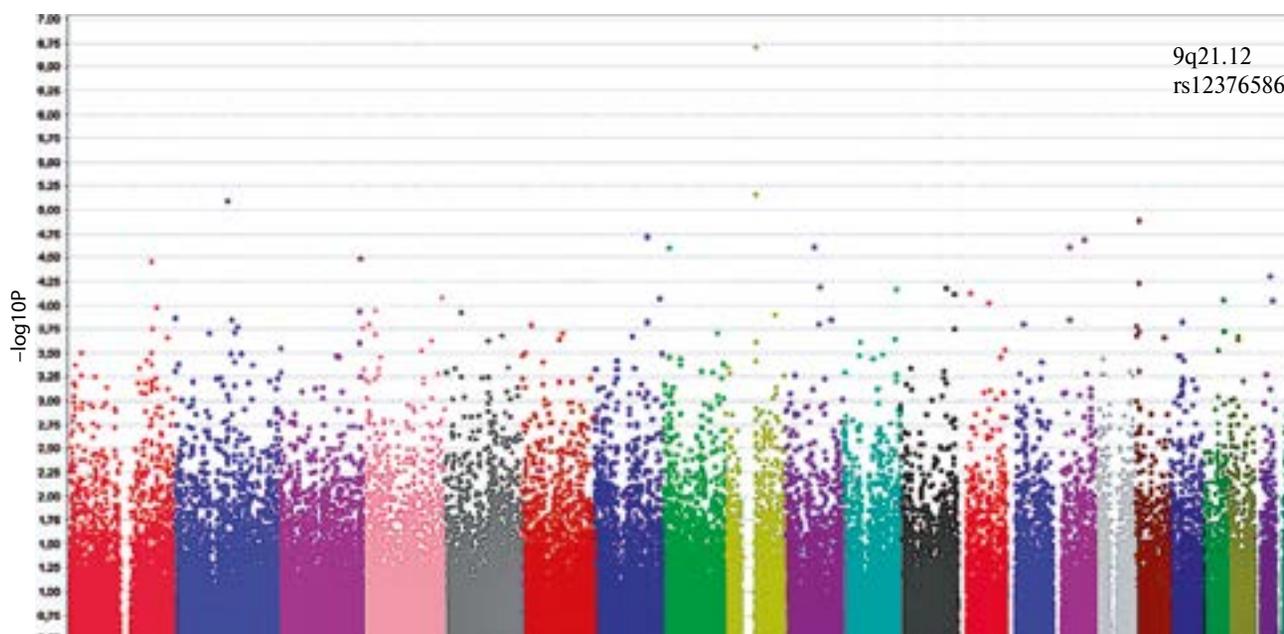
**DOI:** 10.31857/S0016675824010093

Шизофрения – тяжелое и хроническое психическое расстройство, распространенность в течение жизни составляет около 1%. Заболевание характеризуется наличием бреда, галлюцинаций, отсутствием мотивации, алогией, и когнитивными нарушениями [1]. Близнецовые исследования показали, что коэффициент наследуемости шизофрении составляет примерно 79–81% [1].

Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) привели к значительным успехам в выявлении полиморфных локусов риска и анализа генетической архитектуры шизофрении [1]. Так, например Консорциум по психиатрической генетике PGC и другие исследовательские группы за последнее десятилетие провели крупномасштабные GWAS-исследования и идентифицировали множество однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП), ассоциированных с шизофренией [2–5]. Кроме того, M. Lam с соавт. провели метаанализ с участием 56418

больных шизофренией и 78818 здоровых индивидов, объединив результаты исследований на европейских и восточноазиатских популяциях и выявили 176 генетических маркеров риска шизофрении [4].

С целью выявления этноспецифических генетических факторов риска развития параноидной шизофрении нами проведен полногеномный анализ ассоциации у татар из Республики Башкортостан. Объект исследования – 357 пациентов (184 мужчины, 173 женщины) татарской этнической принадлежности с диагнозом параноидная шизофрения (ПШ) F20.xx – согласно с международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10), находящихся на лечении в Республиканской клинической психиатрической больнице № 1 Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. Средний возраст больных составил  $24.9 \pm 8.9$  лет. Средний возраст начала заболевания составил  $22.4 \pm 7.3$  лет. Информацию по этнической



**Рис. 1.** Графическое изображение результатов полногеномного анализа ассоциации 395832 ОНП с параноидной шизофренией у татар (Manhattanplot). На оси X указана хромосомная локализация ОНП, на оси Y – значения отрицательного десятичного логарифма уровня значимости  $p$ -value.

принадлежности до третьего поколения получали путем опроса. Контрольная группа состояла из 383 здоровых индивидов той же возрастной группы, не состоявших на учете у психиатра и нарколога и отрицавших у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям. Средний возраст здоровых доноров составил  $32.4 \pm 12.4$  года.

Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе IlluminaHuman 610-QuadPsychChip, включавшее 610000 ОНП. GWAS-анализ данных полиморфных вариантов выполнен с помощью пакета программ PLINK 2.0 [6]. Подробное описание полногеномного ассоциативного анализа было опубликовано ранее [7]. Для снижения ошибки первого рода была применена поправка FDR-BH (FalseDiscoveryRateBengamini-Hochberg) на число множественных сравнений [8].

Полногеномный анализ ассоциаций, выполненный у индивидов татарской этнической принадлежности, выявил наиболее выраженные различия между больными ПШ и контрольной группой по полиморфным локусам, локализованным в области 9q21.12 (рис. 1). Самая высокая ассоциация ПШ наблюдается с ОНП rs12376586 ( $p = 1.89E-07$ ) (табл. 1).

По данным проекта “1000 геномов”, частота встречаемости аллеля *rs12376586\*G* в популя-

циях мира варьирует от 6.8% в китайских (CHB), 9% в африканских (AFR) и до 55% в популяциях европейского происхождения (CEU), ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;v=rs12376586;vdb=variation](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;v=rs12376586;vdb=variation)).

Ближайшим геном, расположенным на расстоянии около 10 т. п. н от данного полиморфного локуса, является ген *MAMDC2*. Хромосомный регион 9q21.12, в котором располагается данный ген, ассоциирован с редким врожденным заболеванием, проявляющимся характерными чертами лица и умственной отсталостью – синдромом Кабуки у японцев [9]. Ген *MAMDC2* кодирует белок MAM, содержащий домен 2 (mephrin, A5 antigen, proteintyrosinephosphatasemu). Известно, что данный белок участвует в обмене гликозаминогликанов. Ген *MAMDC2* состоит из 14 экзонов, охватывая около 183 т. п. н. геномной ДНК, в настоящее время в данном гене идентифицировано 1182 ОНП. Нарушение обмена гликозаминогликанов приводит к развитию целого класса заболеваний – мукополисахаридозы. К настоящему времени известно по крайней мере 11 нарушений обмена мукополисахаридов с различным первичным биохимическим дефектом, т. е. дефицитом разных ферментов. Вся группа объединена повышенным накоплением в клетках кислых мукополисахаридов и повышенной экскрецией этих веществ с мочой. Большинство из этих заболеваний характеризуется изменениями скелета и внутренних органов, выраженными при разных формах

**Таблица 1.** Однонуклеотидные полиморфные варианты, локализованные в области 9q21.12 и ассоциированные с параноидной шизофренией у татар

Ген	№ rs	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1, больные, %	Частота аллеля 1, контроль, %	Аллель 2	<i>p</i>	<i>p</i> <sub>idr</sub>	OR
—	rs12376586	g.72648582A>G	<i>G</i>	0.359	0.496	<i>A</i>	1.89E-07	0.005	0.569
—	rs11141100	g.72591525A>G	<i>G</i>	0.350	0.469	<i>A</i>	6.72E-06	0.158	0.6178
—	rs4446788	g.72637119C>A	<i>C</i>	0.519	0.424	<i>A</i>	0.000238	0.909	1.482
—	rs1565691	g.72609532T>C	<i>T</i>	0.461	0.368	<i>C</i>	3.75E-04	0.925	1.459
—	rs7032845	g.72562231G>A	<i>A</i>	0.379	0.465	<i>G</i>	1.18E-03	0.925	0.711
<i>MAMDC2</i>	rs4744982	g.72749590G>A	<i>G</i>	0.221	0.157	<i>A</i>	1.56E-03	0.925	1.545
<i>MAMDC2</i>	rs10780851	g.72766144C>T	<i>C</i>	0.254	0.189	<i>T</i>	2.21E-03	0.925	1.489
—	rs10868358	g.72611680G>T	<i>G</i>	0.251	0.187	<i>T</i>	2.79E-03	0.932	1.47
—	rs10511975	g.72530831T>G	<i>G</i>	0.296	0.372	<i>T</i>	2.91E-03	0.932	0.722
—	rs11141106	g.72593325T>G	<i>G</i>	0.311	0.243	<i>T</i>	3.75E-03	0.932	1.404
<i>MAMDC2</i>	rs1927103	g.72722865G>A	<i>G</i>	0.430	0.359	<i>A</i>	6.14E-03	0.932	1.336
<i>MAMDC2</i>	rs10511980	g.72738339A>G	<i>A</i>	0.406	0.338	<i>G</i>	7.17E-03	0.932	1.338
<i>MAMDC2</i>	rs4744977	g.72728822G>A	<i>G</i>	0.364	0.302	<i>A</i>	0.011	0.932	1.331
<i>MDC2</i>	rs10511981	g.72739478C>T	<i>C</i>	0.0854	0.0548	<i>T</i>	0.024	0.954	1.592

**Таблица 2.** Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs12376586 в выборках больных параноидной шизофренией и в контрольных группах у татар

Генотип, аллель	Больные		Контроль		<i>p</i>	<i>p</i> <sub>idr</sub>	OR (CI95%)
	<i>n</i> <sub>i</sub>	<i>p</i> <sub>i</sub> ± <i>s</i> <sub>p</sub> CI (%)	<i>n</i> <sub>i</sub>	<i>p</i> <sub>i</sub> ± <i>s</i> <sub>p</sub> CI (%)			
rs12376586							
<i>G/G</i>	47	13.17 ± 1.79 9.84–17.12	94	24.54 ± 2.2 20.31–29.17	8.2E–05	0.999	0.47 (0.31–0.70)
<i>G/A</i>	162	45.38 ± 2.63 40.13–50.7	192	50.13 ± 2.55 45.01–55.25	0.196	0.881	—
<i>A/A</i>	148	41.46 ± 2.61 36.3–46.76	97	25.33 ± 2.22 21.05–29.99	3.2E–06	0.451	2.09 (1.51–2.89)
<i>G</i>	256	35.85 ± 1.79 32.33–39.49	380	49.61 ± 1.81 46.01–53.21	1.89E–07	0.05	0.57 (0.46–0.7)
<i>A</i>	458	64.15 ± 1.79 60.51–67.67	386	50.39 ± 1.81 46.79–53.99	1.89E–07	0.05	1.76 (1.43–2.17)
rs11141100							
<i>G/G</i>	45	12.61 ± 1.76 9.34–16.5	87	22.72 ± 2.14 18.61–27.24	3.3E–04	0.999	0.49 (0.32–0.74)
<i>G/A</i>	160	44.82 ± 2.63 39.58–50.14	185	48.3 ± 2.55 43.2–53.43	0.342	0.936	—
<i>A/A</i>	152	42.58 ± 2.62 37.39–47.89	111	28.98 ± 2.32 24.49–33.81	1.1E–04	0.999	1.82 (1.32–2.49)
<i>G</i>	250	35.01 ± 1.79 31.51–38.64	359	46.87 ± 1.8 43.29–50.47	6.72E–06	0.632	0.61 (0.49–0.75)
<i>A</i>	464	64.99 ± 1.79 61.36–68.49	407	53.13 ± 1.8 49.53–56.71	6.72E–06	0.632	1.64 (1.33–2.02)

в различной степени, сопровождается грубыми нарушениями нервной системы, приводящими к тяжелому слабоумию [10].

На экспериментальных моделях животных с болезнью Альцгеймера было установлено, что ген *MAMDC2*, высоко экспрессируемый в микроглии, положительно регулирует врожденный противовирусный ответ на нейротропную вирусную инфекцию [11]. Кроме того, секвенирование экзома выявило мутации *de novo* в 32 генах, включая *MAMDC2*, ассоциированные с умственной отсталостью [12]. Ученые из Турции идентифицировали ассоциацию хромосомного региона 9q21.12–21.31 с дефектом нервной трубки, а именно с менингомиелоцеле [13].

В исследуемой нами выборке больных и контроля татарской этнической принадлежности наиболее высокий уровень ассоциации параноидной шизофрении обнаружен с ОНП rs12376586. Гомозиготный генотип *rs12376586\*G/G* у больных параноидной шизофренией встречался редко, в 13.17% случаев, а в контроле определялся чаще – в 24.54% случаев ( $p = 8.02E-05$ ; OR = 0.47, CI95% 0.31–0.70). Частота генотипа *rs12376586\*A/A* была значительно выше у больных ПШ, чем в контрольной группе индивидов (41.46 и 25.33% соответственно) ( $p = 3.2E-06$ , OR = 2.09, CI95% 1.51–2.89).

Поправка на множественное сравнение FDR показала отсутствие статистически значимых различий (*rs12376586\*G/G*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs12376586\*G/A*  $p_{\text{fdr}} = 0.881$ , *rs12376586\*A/A*  $p_{\text{fdr}} = 0.451$ ) (табл. 2).

Анализ распределения частот аллелей данного полиморфного локуса показал, что частота аллеля *rs12376586\*G* у больных ПШ была ниже (35.85%), чем в контроле (49.61%). Аллель *rs12376586\*A* у больных ПШ определялся в 64.15% случаев, а у здоровых – в 50.39%. Показатель отношения шансов для аллеля *rs12376586\*G* составил 0.57 (CI95% 0.46–0.7), ( $p = 1.89E-07$ ), а для аллеля *rs12376586\*A* – 1.76 (CI95% 1.43–2.17). При введении поправки FDR уровень значимости остался статистически значимыми (*rs12376586\*G*  $p_{\text{fdr}} = 0.05$ , *rs12376586\*A*  $p_{\text{fdr}} = 0.05$ ) (табл. 2).

Полиморфный однонуклеотидный вариант rs11141100 в исследуемой нами выборке больных и контроля татарской этнической принадлежности показал высокий уровень ассоциации с ПШ ( $p = 6.72E-06$ ) (табл. 1).

У больных параноидной шизофренией частота гомозиготного генотипа *rs11141100\*G/G* (12.61%) была значительно ниже таковой в контрольной группе (22.72%) ( $p = 3.3E-04$ , OR = 0.49, CI95% 0.32–0.74). Генотип *rs11141100\*A/A* чаще встречался у больных ПШ – в 42.58%, чем в контрольной группе индивидов (28.98%) ( $p = 1.1E-04$ , OR = 1.82, CI95% 1.32–2.49). Частота аллеля *rs11141100\*G* в группе здоровых индивидов была значительно выше (46.87%), чем у больных ПШ (35.01%) ( $p = 6.72E-05$ , OR = 0.61, CI95% 0.49–0.75). Частота аллеля *rs11141100\*A* у больных ПШ (64.99%) превышала его частоту в контрольной группе, где составила 53.13% (OR = 1.64, CI95% 1.33–2.02). Однако после введения поправки FDR уровень значимости оказался статистически не значимым (*rs11141100\*G/G*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs11141100\*G/A*  $p_{\text{fdr}} = 0.936$ , *rs11141100\*A/A*  $p_{\text{fdr}} = 0.999$ , *rs11141100\*G*  $p_{\text{fdr}} = 0.632$ , *rs11141100\*A*  $p_{\text{fdr}} = 0.632$ ) (табл. 2).

Таким образом, в проведенном нами полногеномном исследовании впервые установлена ассоциация однонуклеотидного полиморфного варианта rs12376586 гена *MAMDC2*, расположенного в области 9q21.13 с развитием параноидной шизофрении у татар. Генетическим маркером риска развития параноидной шизофрении у индивидов татарской этнической принадлежности является аллель *rs12376586\*A*. Генетическим маркером пониженного риска развития ПШ у индивидов татарской этнической принадлежности является аллель *rs12376586\*G*.

Ранее (по данным литературы) ассоциация параноидной шизофрении с данной областью и геном *MAMDC2* не была выявлена ни в одной популяции. Результаты исследований по изучению его экспрессии, полиморфных вариантов весьма ограничены. Однако, учитывая данные об участии белка, кодируемого геном *MAMDC2*, в обмене гликозаминогликанов, можно предположить, что полиморфные варианты этого гена могут играть важную роль в формировании структуры наследственной предрасположенности к параноидной шизофрении у татар.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Автор выражает огромную благодарность сотрудникам Департамента психиатрической медицины и клинических нейронаук Кардиффского Университета г. Кардифф (Великобритания) М. О'Donovan, V. Escott-Price, M. Owen, G. Leonenko за советы по генерации и анализу данных и за участие в проекте.

Директору ИБГ УФИЦ РАН проф. Э.К. Хуснутдиновой за научное консультирование.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Li S., Li J., Liu J. et al.* Regulatory variants at 2q33.1 confer schizophrenia risk by modulating distal gene TYW5 expression // *Brain*. 2022. V. 145. № 2. P. 770–786. <https://doi.org/10.1093/brain/awab357>
2. *Trubetskoj V., Pardiñas A.F., Qi T. et al.* Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature*. 2022. V. 604. № 7906. P. 502–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
3. *Ikeda M., Takahashi A., Kamatani Y. et al.* Genome-Wide association study detected novel susceptibility genes for schizophrenia and shared trans-populations/diseases genetic effect // *Schizophr. Bull.* 2019. V. 45. № 4. P. 824–834. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby140>
4. *Lam M., Chen C.Y., Li Z. et al.* Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
5. *Pardiñas A.F., Holmans P., Pocklington A.J. et al.* Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 3. P. 381–389. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0059-2>
6. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
7. *Гареева А.Э.* Полногеномное ассоциативное исследование риска развития шизофрении в Республике Башкортостан // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 8. С. 954–963. <https://doi.org/10.31857/S0016675823080076>
8. *Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N., Golani I.* Controlling the false discovery rate in behavior genetics research // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. № 1-2. P. 279–284. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2)
9. *Kuniba H., Yoshiura K., Kondoh T. et al.* Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome // *J. Hum. Genet.* 2009. V. 54. № 5. P. 304–309. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.30>
10. *Carvalho S., Santos J.I., Moreira L. et al.* Neurological disease modeling using pluripotent and multipotent stem cells: A key step towards understanding and treating mucopolysaccharidoses // *Biomedicines*. 2023. V. 11. № 4. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041234>
11. *Wang Y., Luo W., Wang X. et al.* MAMDC2, a gene highly expressed in microglia in experimental models of Alzheimers disease, positively regulates the innate antiviral response during neurotropic virus infection // *J. Infect.* 2022. V. 84. № 2. P. 187–204. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.004>
12. *Anazi S., Maddirevula S., Fageih E. et al.* Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield // *Mol. Psychiatry*. 2017. V. 22. № 4. P. 615–624. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.113>
13. *Bayri Y., Soylemez B., Seker A. et al.* Neural tube defect family with recessive trait linked to chromosome 9q21.12-21.31 // *Childs Nerv. Syst.* 2015. V. 31. № 8. P. 1367–1370. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2753-z>

## Novel Genetic Risk Marker for Paranoid Schizophrenia in the Chromosomal Region 9q21.13 in Tatars: A Genome-Wide Association Analysis

A. E. Gareeva<sup>1, 2, 3\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. Ufa, 450054 Russia*

<sup>2</sup>*Kemerovo State University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Kemerovo, 650000*

<sup>3</sup>*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Moscow, 125993*

\*e-mail: [annagareeva@yandex.ru](mailto:annagareeva@yandex.ru)

Schizophrenia, the most common severe mental illness, leads to a serious decrease in higher functions, mainly to a change in cognitive functions and perception of reality. Both genetic and environmental factors are involved in its pathogenesis; however, its genetic component still needs to be studied. The aim of the study was to identify genetic markers of paranoid schizophrenia in Tatars from the Republic of Bashkortostan. Genome-wide genotyping of DNA samples was carried out on the PsychChip biochip, which included 610,000 single nucleotide polymorphic variants (SNPs). The studied sample consisted of 357 patients with paranoid schizophrenia and 383 healthy individuals of Tatar ethnicity. As a result of the study, the association of the SNP rs12376586 of the *MAMDC2* gene located in the region 9q21.13 with the development of paranoid schizophrenia in Tatars living in the Republic of Bashkortostan was established for the first time.

**Keywords:** genetics, schizophrenia, genome-wide association analysis, ethnicity, ethnospecific markers, Republic of Bashkortostan, international consortium for psychiatric genetics PGC.

*Российская академия наук*

# ГЕНЕТИКА

Том 60 № 1 2024 Январь

Основан в апреле 1965 г.  
ISSN: 0016-6758

Ежемесячный журнал

*Журнал издается под руководством  
Отделения биологических наук РАН*

*Главный редактор*  
**Н.К. ЯНКОВСКИЙ**

Редакционная коллегия:

А.П. Рысков (*зам. главного редактора*), С.К. Абилов (*зам. главного редактора*),  
С.А. Брускин (*ответственный секретарь*), А.М. Боронин, А.В. Васильев,  
В.А. Гвоздев, Е.К. Гинтер, Т.А. Ежова, И.А. Захаров-Гезехус, С.Г. Инге-Вечтомов,  
Н.А. Колчанов, А.М. Кудрявцев, Л.А. Лутова, А.С. Миронов, Н.С. Мюге,  
Д.В. Политов, В.П. Пузырев, А.Ю. Ржецкий (США), Н.Б. Рубцов,  
М.В. Холодова, Э.К. Хуснутдинова

Редакционный совет:

В.Г. Дебабов, А.В. Кильчевский (Беларусь), С.В. Костров,  
К. Крутовский (Германия), С.А. Лимборская, И.А. Тихонович,  
Д. Уотсон (США), С.В. Шестаков, В. К. Шумный

*Зав. редакцией* Е.В. Тихомирова

*Сайт журнала: <http://www.vigg.ru/genetika/>*

**Москва**  
**ФГБУ «Издательство «Наука»**

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
ПИ № ФС77-66718 от 28 июля 2016 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

---

Подписано к печати	г. Дата выхода в свет	г. Формат $60 \times 88\frac{1}{8}$	Усл. печ. л.	Уч.-изд. л.
	Тираж экз. Зак.	Цена свободная		

---

Учредители: Российская академия наук,  
Институт биологии гена РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

---

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14  
Исполнитель: ФГБУ «Издательство «Наука»:  
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.  
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»:  
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.

16+