

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 6 выпусков в год

Учредители

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия);
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия);
А. Бёрнер – д-р наук (Германия); *В.М. Говорун* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *И. Гроссе* – д-р наук, проф. (Германия); *Г.Л. Дианов* – д-р биол. наук, проф. (Великобритания); *Ю.Е. Дуброва* – д-р биол. наук, проф. (Великобритания); *И.К. Захаров* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *И.А. Захаров-Гезехус* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *С.Г. Инге-Вечтомов* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *И.Е. Керкис* – д-р наук (Бразилия);
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь);
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия);
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция); *Б. Люгтенберг* – д-р наук, проф. (Нидерланды); *В.И. Молодин* – академик РАН, д-р ист. наук (Россия); *В.П. Пузырев* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *А.Ю. Ржецкий* – канд. биол. наук, проф. (США);
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США); *А.О. Рувинский* – д-р биол. наук, проф. (Австралия); *К.Г. Скрябин* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *К.В. Славин* – д-р наук, проф. (США);
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия);
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь);
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия);
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония); *С.В. Шестаков* – академик РАН, д-р биол. наук (Россия); *Н.К. Янковский* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амтиславская – д-р биол. наук, доцент (Россия);
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия); *Ю.С. Аульченко* – д-р биол. наук (Россия); *Д.А. Афонников* – канд. биол. наук, доцент (Россия); *Л.И. Афтанас* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *Е.В. Березиков* – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды); *С.А. Боринская* – д-р биол. наук (Россия); *П.М. Бородин* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *М.И. Воевода* – чл.-кор. РАМН, д-р мед. наук (Россия); *Т.А. Гавриленко* – д-р биол. наук, доцент (Россия); *В.Н. Даниленко* – д-р биол. наук, проф. (Россия);
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия); *Е.А. Долгих* – канд. биол. наук (Россия); *Н.Н. Дыгало* – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия); *С.Л. Киселев* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *В.А. Козлов* – академик РАН, д-р мед. наук (Россия); *Ю.М. Константинов* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *А.В. Кочетов* – д-р биол. наук, проф. (Россия);
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия); *И.Н. Лаврик* – канд. хим. наук (Германия); *Л.А. Лутова* – д-р биол. наук, проф. (Россия); *В.Ю. Макеев* – д-р физ.-мат. наук (Россия); *М.П. Мошкин* – д-р биол. наук, проф. (Россия);
Н.А. Проворов – д-р биол. наук (Россия); *Д.В. Пышный* – д-р хим. наук, проф. (Россия); *А.В. Ратушный* – канд. биол. наук (США); *Е.А. Салина* – д-р биол. наук, проф. (Россия);
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия); *В.А. Степанов* – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 6 times annually

Founders

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Executive Secretary

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

Editorial council

V.S. Baranov, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *L.A. Bespalova*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Agriculture); *A. Börner*, Dr. Sci. (Germany); *M.F. Chernov*, Dr. Sci. (Medicine), Japan; *V.M. Govorun*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany; *G.L. Dianov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain; *Yu.E. Dubrova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain; *J. Le Gouis*, Dr. Sci., France; *S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.E. Kerkis*, Dr. Sci., Brazil; *L.V. Khotyleva*, Full Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus; *E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *A.V. Kilchevsky*, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus; *S.V. Kostrov*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Chemistry), Russia; *B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands; *V.I. Molodin*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (History), Russia; *V.P. Puzyrev*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States; *A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia; *A.Yu. Rzhetsky*, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States; *S.V. Shestakov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *K.G. Skryabin*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *K.V. Slavin*, Professor, Dr. Sci., United States; *I.A. Tikhonovich*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *N.K. Yankovsky*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia; *L.I. Aftanas*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *T.G. Amstislavskaya*, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia; *Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.V. Berezikov*, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia – Netherlands; *S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.N. Danilenko*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *E.A. Dolgikh*, Cand. Sci. (Biology), Russia; *N.N. Dygalo*, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia; *T.A. Gavrilenko*, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *S.L. Kiselev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *A.V. Kochetov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *Yu.M. Konstantinov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.A. Kozlov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia; *O. Krebs*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany; *I.N. Lavrik*, Cand. Sci. (Chemistry), Germany; *L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.Yu. Makeev*, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Russia; *M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *N.A. Provorov*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *D.V. Pyshnyi*, Professor, Dr. Sci. (Chemistry), Russia; *A.V. Ratushny*, Cand. Sci. (Biology), United States; *E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *M.G. Samsonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia; *V.A. Stepanov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia; *M.I. Voevoda*, Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Russia

Генетика человека

- ОБЗОР
- 7 Роль социально-демографической структуры сообществ глухих людей в распространенности наследуемых форм потери слуха
О.Л. Посух, М.С. Бады-Хоо, М.В. Зыцарь,
В.Ю. Михальская, С.А. Лашин, Н.А. Барашков,
Г.П. Романов

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 16 Полиморфизм гена цитохрома *P450 CYP1A1 (ILE462VAL)* в популяциях тундровых ненцев Ямало-Ненецкого автономного округа, нганасан Таймыра и русских Сибири
Р.П. Тийс, Л.П. Осипова, Т.В. Чуркина,
Л.Э. Табиханова, Д.В. Личман, Е.Н. Воронина,
М.Л. Филипенко

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 23 Ассоциация полиморфизма G/A гена *EPAS1* со спортивной и соревновательной успешностью в группе российских борцов
Э.А. Бондарева, Е.З. Година

Генетика животных

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 28 Признаки дестабилизации при отборе на кататонию, проявляющиеся в изменении поведенческих и соматовегетативных параметров у крыс
Т.А. Алехина, Н.А. Пальчикова,
Р.В. Кожемякина, О.И. Прокудина

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 34 Ассоциация несинонимичной замены в гене конденсина *NCAPG* с признаками яйца кур-несушек
О.Ю. Баркова, М.Г. Смарагдов

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 39 Скорость роста и продуктивность бройлерного кросса кур с разными полиморфными типами гена миостатина
Н.В. Дементьева, О.В. Митрофанова, В.И. Тыщенко,
В.П. Терлецкий, А.Ф. Яковлев

Генетика растений

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 44 Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России
И.Г. Адонина, И.Н. Леонова, Е.Д. Бадаева, Е.А. Салина

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 51 Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea var. capitata* L.
М.Н. Шаптуренко, Т.В. Печковская, С.И. Вакула,
А.В. Якимович, Ю.М. Забара, Л.В. Хотылева

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 57 Взаимодействие генов, определяющих форму колоса мягкой пшеницы и расположенных в хромосоме 5AL
А.В. Симонов, Т.А. Пшеничникова, И.Ф. Лапочкина,
Н. Ватанабе

Функциональная генетика и генотоксикология

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 65 Роль белка Pnut и его функциональных доменов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*
К.А. Ахметова, Н.В. Дорогова, Е.У. Боллобова,
И.Н. Чесноков, С.А. Федорова

- ОБЗОР
- 72 Оценка мутагенности химических соединений, физических факторов и неидентифицированных компонентов загрязнения окружающей среды методом соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster*
Л.П. Захаренко, И.К. Захаров

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
- 78 Моделирование генетических процессов формирования резистентности к фипронилю в популяциях колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say)
К.А. Китаев, И.С. Марданшин, Е.В. Сурина,
Т.Л. Леонтьева, М.Б. Удалов, Г.В. Беньковская

Клеточная биология

ОБЗОР

- 87 Фосфорилирование гистона H3Ser10 в делении растительной клетки
Д.Б. Логинова, О.Г. Силкова

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- 96 Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асцита Кребс-2 и различные формы трансплантатов
Е.А. Поттер, Е.В. Долгова, А.М. Минкевич, Я.Р. Ефремов, О.С. Таранов, В.В. Омигов, В.П. Николин, Н.А. Попова, А.С. Проскурина, Е.И. Верещагин, А.В. Козел, В.А. Рогачев, Д.Б. Петров, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, С.С. Богачев

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- 108 Характеристика режимов терапевтического воздействия циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК на опухоль Кребс-2, растущую в асцитной форме, приводящих к эрадикации первичного асцита
Е.А. Поттер, Е.В. Долгова, А.М. Минкевич, В.П. Николин, Н.А. Попова, Я.Р. Ефремов, С.И. Байбородин, В.А. Рогачев, А.С. Проскурина, А.В. Козел, О.С. Таранов, В.В. Омигов, Е.И. Верещагин, Д.Б. Петров, А.А. Останин, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанов, С.С. Богачев

Филогенетика

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- 125 ДНК-штрихкодирование: сколько видов дождевых червей живет на юге Западной Сибири?
С.В. Шеховцов, Н.Э. Базарова, Д.И. Берман, Н.А. Булахова, Е.В. Голованова, С.В. Коняев, Т.М. Кругова, И.И. Любечанский, С.Е. Пельтек

Human genetics

- REVIEW
- 7 Impact of socio-demographic structure of the deaf people communities in prevalence of hereditary hearing loss
O.L. Posukh, M.S. Bady-Khoo, M.V. Zytsar, V.Yu. Mikhalskaia, S.A. Lashin, N.A. Barashkov, G.P. Romanov

- ORIGINAL ARTICLE
- 16 The *ILE462VAL* polymorphism of the cytochrome *P450 CYP1A1* gene among Tundra Nenets in Yamalo-Nenets Autonomous Okrug, Nganasans in the Taimyr Peninsula and Russians in Siberia
R.P. Tiis, L.P. Osipova, T.V. Churkina, L.E. Tabikhanova, D.V. Lichman, E.N. Voronina, M.L. Filipenko

- ORIGINAL ARTICLE
- 23 Association of the *EPAS1* gene G/A polymorphism with successful performance in a group of Russian wrestlers
E.A. Bondareva, E.Z. Godina

Animal genetics

- ORIGINAL ARTICLE
- 28 Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia
T.A. Alekhina, N.A. Palchikova, R.V. Kozhemyakina, O.I. Prokudina

- ORIGINAL ARTICLE
- 34 Association of a non-synonymous substitution in the condensin *NCAPG* gene with traits of eggs in laying hens
O.Yu. Barkova, M.G. Smaragdov

- ORIGINAL ARTICLE
- 39 The rate of weight gain and productivity of chicken broiler cross with various polymorphic types of myostatin gene
N.V. Dementeva, O.V. Mitrofanova, V.I. Tyshchenko, V.P. Terletskiy, A.F. Yakovlev

Plant genetics

- ORIGINAL ARTICLE
- 44 Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions
I.G. Adonina, I.N. Leonova, E.D. Badaeva, E.A. Salina

- ORIGINAL ARTICLE
- 51 Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L.
M.N. Shapturenko, T.V. Pechkovskaya, S.I. Vakula, A.V. Jakimovich, Yu.M. Zabara, L.V. Khotyleva

- ORIGINAL ARTICLE
- 57 Interaction of genes determining the spike shape of wheat and located in 5AL chromosome
A.V. Simonov, T.A. Pshenichnikova, I.F. Lapochkina, N. Watanabe

Functional genetics and genotoxicology

- ORIGINAL ARTICLE
- 65 The role of Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis
K.A. Akhmetova, N.D. Dorogova, E.U. Bolobolova, I.N. Chesnokov, S.A. Fedorova

- REVIEW
- 72 Determination of mutagenicity of chemical compounds, physical factors and environmental pollutants by the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test
L.P. Zakharenko, I.K. Zakharov

- ORIGINAL ARTICLE
- 78 Modeling of genetic processes underlying the development of resistance to fipronil in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say)
K.A. Kitaev, I.S. Mardanshin, E.V. Surina, T.L. Leontieva, M.B. Udalov, G.V. Benkovskaya

Cell biology

REVIEW

- 87 Phosphorylation of histone H3Ser10
in plant cell division
D.B. Loginova, O.G. Silkova

ORIGINAL ARTICLE

- 96 Therapeutic effects
of cyclophosphamide, dsDNA
preparations and their combinations
against Krebs-2 ascites cancer cells
and various cancer transplants
*E.A. Potter, E.V. Dolgova, A.M. Minkevich, Ya.R. Efremov,
O.S. Taranov, V.V. Omigov, V.P. Nikolin, N.A. Popova,
A.S. Proskurina, E.I. Vereschagin, A.V. Kozel,
V.A. Rogachev, D.B. Petrov, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh, N.A. Kolchanov, S.S. Bogachev*

ORIGINAL ARTICLE

- 108 Analysis of different therapeutic
schemes combining cyclophosphamide
and double-stranded DNA preparations
for eradication of Krebs-2 primary
ascites in mice
*E.A. Potter, E.V. Dolgova, A.M. Minkevich,
V.P. Nikolin, N.A. Popova, Ya.R. Efremov, S.I. Baiborodin,
V.A. Rogachev, A.S. Proskurina, A.V. Kozel, O.S. Taranov,
V.V. Omigov, E.I. Vereschagin, D.B. Petrov, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh, N.A. Kolchanov, S.S. Bogachev*

Phylogenetics

ORIGINAL ARTICLE

- 125 DNA barcoding: how many earthworm
species are there in the south of West
Siberia?
*S.V. Shekhovtsov, N.E. Bazarova, D.I. Berman,
N.A. Bulakhova, E.V. Golovanova, S.V. Konyaev,
T.M. Krugova, I.I. Lyubchanskii, S.E. Peltek*

Роль социально-демографической структуры сообществ глухих людей в распространенности наследуемых форм потери слуха

О.А. Посух^{1,2}, М.С. Бады-Хоо^{1,3}, М.В. Зыцарь^{1,2}, В.Ю. Михальская^{1,2}, С.А. Лашин^{1,2}, Н.А. Барашков^{4,5}, Г.П. Романов^{4,5}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республики Тыва «Перинатальный центр Республики Тыва», Кызыл, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск, Россия

⁵ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», Якутск, Россия

Потеря слуха, обусловленная как средовыми, так и генетическими причинами, в той или иной степени затрагивает более чем 10 % населения мира, приводит к инвалидности и существенно снижает качество жизни глухих людей. В среднем 1 из 1 000 новорожденных рождается глухим, и в 50–60 % случаев патология имеет генетическую причину. Несиндромальная наследственная потеря слуха – моногенное заболевание с уникально высокой генетической гетерогенностью. Частота форм «генетической глухоты» варьирует в разных регионах мира и может определяться, как и для многих других моногенных заболеваний, этническим составом населения, изоляцией, эффектами основателя и «бутылочного горлышка», долей близкородственных браков, возможным селективным преимуществом гетерозигот. Предполагается, что в распространенности наиболее частой генетической формы потери слуха, обусловленной мутациями гена *GJB2* (*Cx26*), важную роль играли и определенные социальные факторы: долговременная традиция заключения ассортативных браков между глухими людьми в сочетании с ростом их социальной адаптации и биологической приспособленности (*genetic fitness*). Тартом для этих событий явился «прорыв» глубокой социальной изоляции глухих людей, произошедший около 300 лет назад, когда в Европе (а позднее и в США) возникли школы для глухих с обучением жестовому языку как единому средству коммуникации (лингвистическая гомогамия). Компьютерное моделирование и сравнительное ретроспективное исследование показали, что в США за 200-летний период эти социальные процессы могли привести к удвоению частоты глухоты, обусловленной мутациями гена *GJB2*. Сведения о социально-демографической структуре сообществ глухих людей в прошлом крайне ограничены практически полным отсутствием соответствующих архивных данных. Тем не менее изучение социально-демографических и медико-генетических характеристик современных сообществ глухих людей имеет важное значение как для прогнозирования распространенности различных форм наследственной глухоты, так и понимания роли социальных факторов в эволюционных процессах, происходящих в популяциях человека.

Ключевые слова: наследственная глухота; социальные процессы; ассортативные браки; мутации гена *GJB2* (*Cx26*); имитационное (agent-based) моделирование.

Impact of socio-demographic structure of the deaf people communities in prevalence of hereditary hearing loss

O.L. Posukh^{1,2}, M.S. Bady-Khoo^{1,3}, M.V. Zytzar^{1,2}, V.Yu. Mikhalskaia^{1,2}, S.A. Lashin^{1,2}, N.A. Barashkov^{4,5}, G.P. Romanov^{4,5}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Perinatal Center of the Tyva Republic, Kyzyl, Russia

⁴ Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems, Yakutsk, Russia

⁵ M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

Hearing loss caused by environmental or genetic factors concerns more than 10 % of the world population. It leads to disability and considerably reduces the life quality of deaf people. On average, 1 in 1,000 newborns are born deaf, and 50-60 % of cases are due to genetic causes. Nonsyndromic hereditary deafness is a monogenic disease with uniquely high genetic heterogeneity. The prevalence of some forms of genetic deafness varies in different populations and could be determined, as for many other genetic diseases, by the ethnic composition of a population, isolation, founder and «bottleneck» effects, the proportion of consanguineous marriages, and probable heterozygote advantage. It is assumed that high prevalence of hearing loss due to mutations in the *GJB2* (*Cx26*) gene was also influenced by some social factors: a long-standing tradition of assortative marriages between deaf people, combined with growth of their social adaptation and genetic fitness. The start for these events was the breakdown of the deep social isolation of deaf people, which occurred about 300 years ago in Europe, and later in the US, when special schools for the deaf with learning sign language as a common tool for communication were established (linguistic homogamy). Computer simulations and comparative retrospective study showed that over the past 200 years these social processes can have doubled the frequency of deafness in the US caused by

REVIEW

Received 13.10.2015 г.

Accepted for publication 17.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

the *GJB2* gene mutations. Information about the socio-demographic structure of deaf communities in the past is extremely limited by an almost complete lack of relevant archival data. Nevertheless, studies of socio-demographic and medical-genetic characteristics of deaf people's contemporary communities are important for predicting the prevalence of inherited forms of deafness, as well as for understanding the impact of social factors on the evolutionary processes occurring in human populations.

Key words: hereditary deafness; social processes; assortative marriages, the *GJB2* gene mutations; agent-based modeling.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Посух О.Л., Бады-Хоо М.С., Зыцарь М.В., Михальская В.Ю., Лашин С.А., Барашков Н.А., Романов Г.П. Роль социально-демографической структуры сообществ глухих людей в распространенности наследуемых форм потери слуха. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):7-15. DOI 10.18699/VJ16/098

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Posukh O.L., Bady-Khoo M.S., Zytsar M.V., Mikhalskaia V.Yu., Lashin S.A., Barashkov N.A., Romanov G.P. Impact of socio-demographic structure of the deaf people communities in prevalence of hereditary hearing loss. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):7-15. DOI 10.18699/VJ16/098

Потеря слуха, обусловленная средовыми или генетическими причинами, затрагивает значительную часть населения, приводит к инвалидности и существенно снижает качество жизни больных. Частота «генетической» глухоты составляет не менее 1 : 1 500–2 000 новорожденных (Marazita et al., 1993; Morton, Nance, 2006) и превышает частоты моногенных заболеваний, включенных в программы массового неонатального скрининга (фенилкетонурия ~ 1 : 10 000, врожденный гипотиреоз ~ 1 : 4 000–5 000, галактоземия ~ 1 : 15 000–20 000, муковисцидоз ~ 1 : 3 000–6 000, аденогенитальный синдром ~ 1 : 5 000–15 000), что, безусловно, делает эту патологию социально значимой проблемой.

Основными направлениями в исследованиях генетических форм потери слуха являются: 1) изучение разнообразия генетического контроля нарушений слуховой функции; 2) изучение распространенности наследуемых форм потери слуха в различных регионах мира и 3) выявление факторов, определяющих «накопление» тех или иных генетических форм патологии слуха.

Разнообразие генетического контроля и распространенность наследуемых форм потери слуха в различных регионах мира

Наследственная потеря слуха характеризуется клиническим разнообразием и уникальной генетической гетерогенностью. Известно не менее 300–400 синдромов, одним из клинических признаков которых является снижение/потеря слуха (Toriello, Smith, 2013), но преобладающей формой (~ 70 %) является несиндромальная (изолированная) нейросенсорная тугоухость/глухота, которая в 75–80 % случаев имеет аутосомно-рецессивный тип наследования, в 15–20 % – аутосомно-доминантный и в 3–5 % случаев она либо сцеплена с X-хромосомой, либо обусловлена мутациями мтДНК (Morton, Nance, 2006). К настоящему времени в ассоциации с несиндромальной потерей слуха известно около 140 генетических локусов и идентифицировано несколько десятков генов, кодирующих разнообразные по структуре и функциям

белки (белки ионного транспорта, внеклеточного матрикса и цитоскелета, различные структурные белки, а также компоненты клеточных мембран, адгезивные белки, транскрипционные факторы и другие белки с неизвестными пока функциями) (Van Camp, Smith, 2015). Кроме того, в митохондриальном геноме выявлены мутации мтДНК, ассоциированные с нарушениями слуха, которые возникают в основном в генах, контролирующих белок-синтезирующий аппарат митохондрий – тРНК и рРНК (MITOMAP: <http://www.mitomap.org>). Данные о картировании локусов и идентификации генов, ответственных за потерю слуха, аккумулируются на Web-ресурсе Hereditary Hearing loss Homepage (<http://hereditaryhearingloss.org>), который в настоящее время является наиболее полной мировой базой данных о генетическом контроле нарушений слуха (Van Camp, Smith, 2015).

Несмотря на широкое разнообразие генетического контроля нарушений слуховой функции, известно, что наибольший патогенетический вклад в развитие изолированной потери слуха во многих популяциях мира имеет ген *GJB2* (13q11-q12, MIM #121011). Так, например, в большинстве европейских стран мутации гена *GJB2* являются причиной потери слуха у ~ 30–50 % (Morton, Nance, 2006), а в азиатских популяциях – у ~ 5–20 % больных (Park et al., 2000; Liu et al., 2002; Ohtsuka et al., 2003; RamShankar et al., 2003; Wattanasirichaigoon et al., 2004; Dai et al., 2009; Tekin et al., 2010). Ген *GJB2* кодирует коннексин 26 (Cx26), белок щелевых контактов (gap junction protein), экспрессия которого была показана в тканях внутреннего уха, коже и других тканях. Молекулы коннексина 26 формируют межклеточные каналы, по которым в тканях внутреннего уха происходит ионный обмен, необходимый для нормального процесса звуковосприятия. Мутации в гене *GJB2* приводят к нарушению структуры и функции коннексина 26 и в конечном итоге к нарушению процесса звуковосприятия и необратимой потере слуха. В настоящее время известно более 300 мутаций, полиморфных вариантов и неклассифицированных пока вариаций последовательности гена *GJB2* (Stenson

et al., 2014; Van Camp, Smith, 2015). Выявлена этническая и территориальная специфичность мутационного спектра и распространенности отдельных мутаций гена *GJB2* в различных популяциях мира. Идентифицировано несколько «главных», мажорных, рецессивных мутаций этого гена, преобладающих в той или иной популяции. Так, например, мутация с.35delG широко распространена в Европе (Gasparini et al., 2000; Rabionet et al., 2000); мутация с.235delC – в ряде азиатских стран (Park et al., 2000; Liu et al., 2002; Ohtsuka et al., 2003; Dai et al., 2009); с.167delT характерна для евреев ашкенази (Morell et al., 1998; Lerer et al., 2000); p.Arg143Trp – для некоторых популяций Западной Африки (Brobby et al., 1998; Hamelmann et al., 2001); p.Val37Ile имеет большую распространенность в Юго-Восточной Азии (Wattanasirichaigoon et al., 2004); p.Trp24* – в Индии (RamShankar et al., 2003); с.-23+1G>A – у якутов (Barashkov et al., 2011; Пшенникова и др., 2015), а мутация p.Trp172Cys с высокой частотой выявляется у тувинцев (Бады-Хоо и др., 2014а).

В связи с тем что мутации гена *GJB2* являются наиболее важной причиной наследуемых форм потери слуха, во многих странах разработана и успешно применяется молекулярная диагностика случаев тугоухости/глухоты, основанная на поиске у пациентов мутаций этого гена.

В генетико-эпидемиологических исследованиях, проводимых в России, были выявлены этнические и региональные отличия распространенности наследуемых случаев потери слуха (Пузырев и др., 1999; Зинченко и др., 2003, 2007, 2009а, б, 2012а, б; Тарская и др., 2004; Шокарев и др., 2005; Бады-Хоо и др., 2014б; Пшенникова и др., 2015).

Молекулярная диагностика случаев потери слуха в России до недавнего времени ограничивалась скринингом только мутации с.35delG (ген *GJB2*) (Маркова и др., 2002, 2008; Некрасова и др., 2002; Хидиятова и др., 2002; Зинченко и др., 2003; Шокарев и др., 2005; Журавский и др., 2009; Шаронова и др., 2009), которая является основной причиной потери слуха в европейских странах. Такой подход с учетом этнической и географической специфичности мутационного спектра *GJB2* вряд ли может быть адекватной диагностической методологией в применении ко всему многонациональному населению России. В последние годы в связи с внедрением в молекулярную диагностику метода ДНК-секвенирования стало возможным выявление более широкого мутационного спектра гена *GJB2*, и для ряда российских популяций было показано, что доля пациентов с потерей слуха, обусловленной мутациями гена *GJB2* (варьирует в зависимости от региона исследования), может достигать 40–50 % (Posukh et al., 2005; Осетрова и др., 2010; Божкова и др., 2011; Близнач и др., 2012; Бады-Хоо и др., 2014а; Пшенникова и др., 2015).

Мутации в гене *SLC26A4* (*pendrin*, 7q22-q31, MIM 605646), вероятно, являются второй по значимости генетической причиной потери слуха по крайней мере в азиатских популяциях, в которых до 10 % всех генетических случаев глухоты обусловлено мутациями этого гена (Park et al., 2003; Tsukamoto et al., 2003; Lee et al., 2008; Du et al., 2013).

Имеется существенно меньше информации о распространенности генетических форм потери слуха,

определяемых мутациями других генов. Последовательное секвенирование по Сэнгеру всего множества генов, контролирующих нарушения слуха, пока неосуществимо на практике, и только в немногих лабораториях можно провести молекулярную диагностику нескольких других, кроме *GJB2*, ассоциированных с потерей слуха генов (*SLC26A4*, *MYO15*, *TMCI*, *CDH23* и *OTOF*). Во многих случаях этиология наследуемой глухоты и после тестирования наиболее значимых «генов глухоты» остается неясной. Тем не менее в последнее время для решения этой проблемы («много генов – один фенотип») применяются новейшие технологии секвенирования ДНК, включая экзомное секвенирование (Brownstein et al., 2011; Diaz-Horta et al., 2012; Sirmaci et al., 2012 и др.). Таким образом, со временем следует ожидать новых сведений о генах, ассоциированных с потерей слуха, и особенностях распространенности специфичных форм «генетической глухоты» в различных регионах мира.

Для некоторых форм наследственной потери слуха уже установлено, что, как и для многих других моногенных заболеваний, их «накопление» в той или иной популяции определяется такими факторами, как этнический состав населения, изоляция, доля близкородственных браков, эффекты основателя и «бутылочного горлышка» (Groce, 1985; Scott et al., 1995; Winata et al., 1995; Van Laer et al., 2001; RamShankar et al., 2003; Ben Arab et al., 2004; Lezirovitz et al., 2008; Sirmaci et al., 2009; Barashkov et al., 2011 и др.).

Но для случаев глухоты, обусловленной мутациями гена *GJB2*, была предложена гипотеза о том, что на широкую распространенность этой наследственной патологии, в отличие от большинства моногенных заболеваний, могли повлиять и определенные социальные факторы: существующая в ряде регионов мира долговременная традиция заключения ассортативных браков между глухими людьми (выбор брачного партнера по патологическому фенотипу) в сочетании с ростом их социальной адаптации и биологической приспособленности (*genetic fitness*) (Nance et al., 2000; Nance, 2003; Nance, Kearsey, 2004).

Социальные факторы в распространенности «генетической глухоты»

В прошлом потеря слуха, нарушая возможность восприятия предупреждающей и тревожной информации, ориентации и социальной коммуникации, резко снижала биологическую приспособленность глухого человека, и доля случаев с генетически детерминированной потерей слуха была сравнительно невелика.

В настоящее время в ряде стран Европы и США наблюдается отчетливая тенденция к неуклонному росту «генетической глухоты», обусловленной мутациями в гене *GJB2* (Cx26) (Morton, Nance, 2006). Компьютерное имитационное моделирование показало, что в США число индивидуумов с глухотой, обусловленной рецессивными мутациями этого гена, могло бы увеличиться в два раза за 200 лет при росте доли ассортативных браков между глухими от 0 до 0,9 и возрастании их биологической приспособленности от 0 до 1 (Nance, Kearsey, 2004). Предполагается, что толчком для этих процессов послужило создание школ для глухих около 300 лет назад в ряде европейских стран (и несколько позднее – в США)

(Bender, 1981) и последующее активное развитие на их базе жестового языка – универсального способа коммуникации между глухими людьми (Nance, Kearsley, 2004).

Для справки. Жестовый язык (язык жестов) – самостоятельный, естественно возникший или искусственно созданный язык, состоящий из комбинации жестов, каждый из которых производится руками в сочетании с мимикой, формой или движением рта и губ, а также в сочетании с положением корпуса тела. Жестовый язык не является единым для всех глухих людей: в мире зафиксирован по меньшей мере 121 жестовый язык глухих (Ethnologue..., 2015). Первые учебно-воспитательные центры для детей с нарушениями слуха были созданы во Франции (в 1760 г.) и в Германии (в 1778 г.). Основой языков обучения стали естественные жестовые языки, развивавшиеся в национальных сообществах глухих людей. На их базе были созданы жестовые интерпретации французского и немецкого языков, которые были дополнены специальными «методическими» жестами (для обозначения предлогов, грамматического рода и т.п.). В дальнейшем французский и немецкий жестовые языки легли в основу многих других национальных жестовых языков. Например, в США основой для американского жестового языка («Амслен» – от American Sign Language, ASL) была французская школа. Надо заметить, что в настоящее время национальные жестовые языки обладают собственной структурой и историей и практически не зависят от соответствующих звучащих языков. В России первая сурдопедагогическая школа открылась в 1806 г. в г. Павловске и, как и в США, работала по французской методике. Позднее, в 1860 г., сурдопедагогическая школа, использующая немецкую методику, открылась в Москве. Современный русский (или российский) жестовый язык был сформирован на методической базе этих двух школ и в республиках бывшего СССР централизованно распространялся через создание школ и учреждений для глухих. Видимо, с этим связан феномен преобладания единого жестового языка на территории бывшего Советского Союза (Прозорова, 2007).

Сообщества глухих людей – «Deaf Culture»

Единое лингвистическое пространство (жестовый язык) способствовало улучшению условий жизни и консолидации глухих людей. В странах Европы и США это привело к формированию особых микросоциумов, «Deaf Culture» («Культура глухих», «Глухой мир»), со своим собственным, жестовым, языком, своеобразными традициями и культурой (Padden, Humphries, 1988; Andersson, 1991; Arnos et al., 1991; Christiansen, 1991; Ruben, 1991; Prezioso, 1995; Stern et al., 2002 и др.). В этих сообществах отсутствие слуха рассматривается в социокультурном аспекте, а не как отклонение от нормы. Самоопределение глухих людей, относящих себя к «Deaf Culture», выражается, в частности, в написании слова «deaf» (глухой) с прописной буквы – «Deaf» (Arnos et al., 1991). Важными социально-демографическими характеристиками этих микросоциумов являются высокая ассортативность браков между глухими партнерами, основанная на лингвистической гомогамии (использовании жестового языка), и, как показано в некоторых исследованиях, позитивное

отношение глухих супругов к рождению глухих детей (Middleton et al., 1998, 2001; Stern et al., 2002).

Так, в Великобритании было проведено анкетирование глухих людей, принадлежащих к «Deaf Culture». Анкета содержала ряд вопросов, позволяющих выяснить отношение глухих людей к генетическому тестированию, пренатальной диагностике и их предпочтения в отношении состояния слуха у их будущих детей (Middleton et al., 1998). Оказалось, что 55 % опрошенных негативно относятся к генетическому тестированию и считают, что оно может принести скорее вред, чем пользу; 46 % считают, что результаты генетического тестирования могут дискриминировать глухих людей. Пренатальные ДНК-тесты для диагностики слуха будущего ребенка отказались бы пройти 60 % респондентов, 16 % затруднились с ответом, 8 % вообще не ответили на этот вопрос и только 16 % опрошенных согласились бы пройти такое тестирование. В вопросе о предпочтениях состояния слуха у их ребенка 15 % респондентов ответили в пользу рождения глухого ребенка, 74 % затруднились с ответом о своих предпочтениях по этому вопросу, 5 % не захотели ответить на этот вопрос и только 6 % хотели бы ребенка с нормальным слухом. В более позднем исследовании (Middleton et al., 2001) среди трех категорий респондентов: (1) глухие, (2) плохо слышащие или поздно оглохшие и (3) нормально слышащие люди, которые уже имели глухого ребенка или являлись детьми глухих родителей, был проведен опрос для выяснения их отношения к пренатальной ДНК-диагностике и прерыванию беременности в зависимости от состояния слуха будущего ребенка (Middleton et al., 2001). Оказалось, что 21, 39 и 49 % из категорий (1), (2) и (3), соответственно, хотели бы пройти пренатальный генетический тест. Только 6 % глухих людей из категории (1), 11 % – из категории (2) и 16 % – из категории (3) выразили намерение прервать беременность, если будущий ребенок будет глухим. Среди глухих респондентов 2 % ответили, что они предпочитают иметь глухого ребенка и прервали бы беременность при выявлении у их будущего ребенка нормального слуха (Middleton et al., 2001).

В России существует общественная организация инвалидов (Всероссийское общество глухих, ВОГ (<http://www.voginfo.ru/>), которая была создана в РСФСР (СССР) в 1926 г. В настоящее время ВОГ насчитывает в своих рядах около 90 000 человек с нарушениями слуха, включает в себя 79 региональных и более 800 местных отделений на всей территории Российской Федерации. Главными задачами ВОГ являются защита прав и интересов людей с нарушениями слуха, их социальная реабилитация и интеграция в современное общество, обеспечение равных с другими гражданами возможностей.

Насколько нам известно, исследования, направленные на получение комплексных социо-демографических характеристик сообществ глухих людей и выяснение роли локальных и региональных отделений ВОГ в консолидации людей с потерей слуха, в России не проводились.

Ассортативные браки и уровень брачности глухих людей

Вероятно, благодаря улучшающейся социальной адаптации и консолидации глухих людей, владеющих жестовым

языком, во многих регионах Европы и США наблюдается отчетливая тенденция к увеличению доли ассортативных браков между глухими (Schein, Delk, 1974; Rose, 1975; Arnos et al., 2008; Blanton et al., 2010).

Одним из относительно немногочисленных комплексных исследований социо-демографических характеристик сообществ глухих людей в Европе является работа Carlsson с коллегами (2004), в которой был проведен сравнительный анализ двух наиболее крупных сообществ глухих людей Швеции, проживающих в округах Narke и Varmland (Carlsson et al., 2004/2005). Эти округа, сходные по основным демографическим характеристикам (общей численности, числу взрослых людей), отличаются по уровню «развития» сообщества глухих людей. В округе Narke в местной ассоциации глухих людей зарегистрировано 450 человек, из них 82 % сосредоточены в крупном городе Örebro. В округе Varmland в ассоциацию глухих людей входит около 100 человек и только 33 % живет в городе Karlstad, тогда как остальные рассредоточены по всему округу. В округе Narke для глухих детей доступны как дошкольное обучение, так и высшее образование, здесь отмечается самое большое в Швеции число глухих студентов, обучающихся в университете. В округе Varmland условия обучения глухих детей ограничены дошкольным образованием. Таким образом, в округе Narke имеется хорошо развитая социальная инфраструктура для глухих людей, уровень консолидации которых существенно выше, чем в округе Varmland. При практически равных уровнях брачности (37,1 % глухих людей состояло в браке в Narke и 35,1 % – в Varmland) были выявлены контрастные уровни брачной ассортативности: в округе Narke 99 % глухих людей имели глухого брачного партнера, а в округе Varmland зафиксировано только 10 % таких браков (Carlsson et al., 2004/2005).

В работе Blanton с коллегами (2010), в которой анализировались данные о выпускниках старейшего в США крупного образовательного учреждения для глухих (Gallaudet University, Галлодетский университет), сообщается о высоком уровне брачности глухих людей (0,88), сходном с таковым у их нормально слышащих братьев/сестер (0,89), а доля браков между глухими людьми (ассортативные браки) составила 79 % (Blanton et al., 2010). Национальная перепись глухих, проведенная в США в 1970 г. (The 1970 National Census of the Deaf Population), зафиксировала 80–90 %-й уровень брачной ассортативности глухих людей, соответствующий данным из других источников (Rapin, 1978; Schein, 1978). Таким образом, наблюдается определенный рост этого показателя по сравнению с аналогичными данными (75 %), полученными в начале XIX в. (Schein, Delk, 1974; Rose, 1975).

Существенно более низкий уровень брачной ассортативности между глухими людьми был выявлен в немногочисленных исследованиях, проведенных в других регионах мира (Chaabani et al., 1995; Tekin, Arici, 2007, Tekin et al., 2010). Так, в Тунисе частота ассортативных браков между глухими составляет около 10–30 % (Chaabani et al., 1995), в Турции – 46,8 % (Tekin, Arici, 2007), в Монголии – 37,5 % (Tekin et al., 2010).

Частота «генетической глухоты», обусловленной мутациями гена *GJB2* (Cx26), коррелирующая с уровнем

брачной ассортативности глухих людей в Европе и США, может достигать 40–50 % (Nance, 2003; Morton, Nance, 2006). Вклад мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха в ряде азиатских регионов гораздо ниже. Например, у монголов – не более 5 %, что, как предполагает Tekin с коллегами (2010), определяется более низким уровнем консолидации и брачной ассортативности глухих людей в Монголии (37,5 %), где изучение жестового языка началось сравнительно недавно (Tekin et al., 2010). Действительно, первая школа для глухих детей открылась в Улан-Баторе в начале XX в., но жестовый язык оставался примитивным вплоть до 1995 г., когда волонтеры Американского корпуса мира (The American Peace Corps) разработали структурированный жестовый язык, адаптированный к монгольскому языку (Tekin et al., 2010). Косвенные свидетельства отсутствия традиции заключения браков между глухими в Китае были получены при проведении сегрегационного анализа в семьях с глухотой из Шанхая: только в 8 из 260 родительских пар обследованных глухих пробандов оба родителя были глухими (Hu et al., 1987).

Репродукция глухих людей

Параметры репродукции являются важной мерой для оценки биологической приспособленности (genetic fitness) как популяции в целом, так и групп индивидуумов с генетическими заболеваниями. В ряде работ были предприняты попытки сравнить параметры репродукции глухих людей (среднее число детей) с таковыми в общей популяции или же с их здоровыми братьями/сестрами (Schein, Delk, 1974; Hu et al., 1987; Liu et al., 1994; Carlsson et al., 2004/2005; Blanton et al., 2010; Tekin et al., 2010). В исследовании Blanton с коллегами (2010) было показано, что среднее число детей у выпускников Галлодетского университета, состоящих в браке, было значительно меньше по сравнению с таким же показателем у их здоровых братьев/сестер (2,06 и 2,26 соответственно). Но при рассмотрении типов браков глухих людей выяснилось, что в ассортативных браках между глухими среднее число детей было выше (2,11), чем в браках между глухим и нормально слышащим партнером (1,85). Тем не менее общая биологическая приспособленность (genetic fitness) глухих вне зависимости от их брачного статуса и с учетом бездетных индивидуумов оказалась сниженной (0,88) (Blanton et al., 2010). В работе Schein, Delk (1974), основанной на данных переписи глухих в США (1970 г.), биологическая приспособленность женщин варьировала от 0,31 до 0,77 (в зависимости от возрастной группы) в сравнении с общей популяцией США (Schein, Delk, 1974). Анализ параметров репродукции у глухих людей в двух округах Швеции выявил существенно более низкое среднее число детей на женщину (1,16 – в округе Varmland и 1,33 – в округе Narke) по сравнению с общепопуляционными данными для обоих округов (1,63–1,65), причем различия между округами, вероятно, были обусловлены значимым преобладанием бездетных глухих женщин в округе Varmland по сравнению с Narke (47,3 и 38,5 % соответственно) при популяционной доле бездетных женщин в Varmland – 18,8 % и в Narke – 19,7 % (Carlsson et al., 2004/2005). Значительное снижение биологической приспособленности глухих по сравнению с их здоровыми

братьями/сестрами было выявлено в двух исследованиях, проведенных в Китае (0,6 и 0,78) (Hu et al., 1987; Liu et al., 1994). В Монголии относительная биологическая приспособленность глухих людей (вне зависимости от брачного статуса и с учетом бездетных индивидов) составила 0,62 при значимо сниженном среднем числе детей у глухих, состоящих в браке (2,7), по сравнению с их слышащими братьями/сестрами (3,6) (Tekin et al., 2010).

Таким образом, несмотря на разные подходы, используемые в немногочисленных исследованиях параметров репродукции глухих людей, было показано, что биологическая приспособленность (genetic fitness) глухих людей, выражаемая в среднем числе детей, варьирует, как и для других человеческих групп, в зависимости от географической локализации, социо-культурной и этнической среды, но остается сниженной по сравнению с нормально слышащими индивидами.

Некомплементарные браки

Вероятность рождения глухих детей варьирует в различных вариантах брачных пар с генетическими и негенетическими причинами глухоты. У супругов, чья глухота обусловлена рецессивными мутациями одного и того же гена (некомплементарные браки), могут родиться только глухие дети, и с той же самой генетической причиной глухоты. Следовательно, такие браки могут существенно увеличить частоту какой-либо рецессивной мутации, вызывающей глухоту, в последующих поколениях.

В работе Agnos с коллегами (2008), выполненной на основе монументального труда «Marriages of the Deaf in America» (Fay, 1898), уникальной коллекции родословных глухих людей за период 1801–1894 гг., и соответствующих данных за период XX в., полученных с привлечением личных данных выпускников Галлодетского университета, был проведен сравнительный анализ брачной структуры глухих людей, показавший достоверный рост числа некомплементарных браков за прошедшие 100 лет (4,2 и 23,0 % соответственно) (Agnos et al., 2008). Кроме того, сравнительный анализ частоты мутаций в гене *GJB2* (Cx26) в когортах больных трех возрастных групп (1921–1940 г.р., 1941–1960 г.р., 1961–1980 г.р.) выявил достоверный рост частоты *GJB2*-мутаций на этом сравнительно коротком временном отрезке (60 лет) (Agnos et al., 2008).

Компьютерное моделирование влияния социальных факторов на распространенность наследуемых форм потери слуха

Математическое и компьютерное моделирование широко используется при исследовании эпидемических (Sattenspiel, Dietz, 1995; Hethcote, 2006; Mossong et al., 2008) и неэпидемических (Di Rienzo, Hudson, 2005; Peng et al., 2007; Hoban et al., 2012) болезней для анализа и прогнозирования их распространенности в популяциях. Имитационное или агентное (agent-based) моделирование в настоящее время является одним из наиболее популярных подходов для построения компьютерных моделей в биологии, в том числе и в области моделирования различных болезней. Подобные подходы позволяют строить составные иерархические (многоуровневые, multiscale) модели, в настоящее время считающиеся одним из ос-

новных инструментов системной биологии (Ayton et al., 2007; Ferrer, 2007; Ferrer et al., 2008; Martins et al., 2010; Twycross et al., 2010; Qu et al., 2011). С помощью имитационного моделирования впервые было показано, что существенный рост доли «генетической» глухоты, обусловленной рецессивными мутациями гена *GJB2* (Cx26), может определяться долговременной традицией ассортативных браков между глухими людьми и их возросшей биологической приспособленностью (genetic fitness) (Nance, Kearsley, 2004).

Наряду с известными факторами, влияющими на частоту многих моногенных генетических заболеваний (этнический состав населения, изоляция, эффекты основателя и «бутылочного горлышка», доля близкородственных браков), предполагается, что в распространенности по крайней мере наиболее частой генетической формы потери слуха, обусловленной мутациями гена *GJB2* (Cx26), важную роль играли и определенные социальные факторы: долговременная традиция заключения ассортативных браков между глухими людьми в сочетании с ростом их социальной адаптации и биологической приспособленности (genetic fitness).

Сообщества глухих людей существуют во многих странах мира, но структура и степень консолидации этих микросоциумов в разных популяциях, вероятно, различны. Отношение общества к глухим также широко варьирует: от признания «Deaf Culture» как особого социокультурного сообщества и жестового языка в качестве официального до выраженной социальной дискриминации людей с ограниченным или утраченным слухом. Социально-демографические характеристики (уровень брачности, брачная структура, репродукция, коммуникативные возможности, уровень и качество жизни, социальный статус глухих людей, степень изоляции/внутренней консолидации) сообществ людей с потерей слуха достаточно активно изучаются в основном только в странах Европы и США. Исследования такого рода на основе современных данных в других регионах мира очень редки, а возможность ретроспективного анализа соответствующей информации ограничена крайне малым числом подобных исследований в прошлом. В России такие исследования не проводились.

Оценка потенциальной роли социально-демографической структуры современных сообществ глухих людей в совокупности с молекулярно-генетическими исследованиями наследуемой потери слуха, компьютерное моделирование возможной причинно-следственной взаимосвязи социально-демографических параметров сообществ глухих людей и частоты определенных форм «генетической» глухоты имеют фундаментальное и практическое значение. Такие данные могут внести весомый вклад в понимание роли социальных факторов в эволюционных процессах, происходящих в популяциях человека, и могут быть использованы для долгосрочного прогноза распространенности наследуемых форм потери слуха в изучаемых регионах.

Коллектив авторов работает над получением структурированных данных об уровне брачности, особенностях брачной структуры и параметрах репродукции людей с тяжелой потерей слуха, проживающих в ряде регионов Сибири (Тува, Алтай, Якутия), и сопоставлением их

с распределением генотипов по гену *GJB2*, выявленных у глухих индивидуумов в результате эпидемиологических и молекулярно-генетических исследований (Posukh et al., 2005; Barashkov et al., 2011; Бады-Хоо и др., 2014а, б; Пшенникова и др., 2015). Мы предполагаем, что такой комплексный подход даст уникальную возможность впервые оценить потенциальную роль социально-демографических факторов, отражающих современное состояние сообществ глухих людей в различных регионах Сибири, в формировании специфики генетической компоненты и ее вклада в этиологию потери слуха. Компьютерное имитационное моделирование, которое будет проведено на основе совокупности полученных социально-демографических, молекулярно-генетических и популяционно-генетических данных, позволит определить возможные тренды распространенности наследуемой потери слуха в изучаемых регионах Сибири.

Acknowledgments

This work was supported by Budgeted Project 0324-2015-0004; the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, State Contract 6.656.2014/K «The genetic history of East Siberian peoples and endemic forms of hereditary impaired hearing»; and the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-04860_a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andersson Y. Sociological implications of genetic deafness. *Am. J. Hum. Genet. Suppl.* 1991;49:5.
- Arnos K.S., Israel J., Cunningham M. Genetic counselling for the deaf: medical and cultural considerations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1991;630:212-222. DOI 10.1111/j.1749-6632.1991.tb19590.x
- Arnos K.S., Welch K.O., Tekin M., Norris V.W., Blanton S.H., Pandya A., Nance W.E. A comparative analysis of the genetic epidemiology of deafness in the United States in two sets of pedigrees collected more than a century apart. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;83(2):200-207. DOI 10.1016/j.ajhg.2008.07.001
- Ayton G.S., Noid W.G., Voth G.A. Multiscale modeling of biomolecular systems: in serial and in parallel. *Curr. Opin. in Struc. Biol.* 2007; 17(2):192-198. DOI 10.1016/j.sbi.2007.03.004
- Bady-Khoo M.S., Bondar A.A., Morozov I.V., Zytsar M.V., Mikhalskaya V.Yu. Skidanova O.V., Barashkov N.A., Mongush R.Sh., Omzar O.S., Tukar V.M., Posukh O.L. Study of hereditary forms of hearing loss in the Republic of Tuva. II. Evaluation of the mutational spectrum of the *GJB2* (*Cx26*) gene and its contribution to the etiology of hearing loss. *Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow)*. 2014a;13(11):30-40.
- Bady-Khoo M.S., Posukh O.L., Zorkoltseva I.V., Skidanova O.V., Barashkov N.A., Omzar O.S., Mongush R.Sh., Bamba O.M., Tukar V.M., Zytsar M.V., Mikhalskaya V.Yu. Study of hereditary hearing loss in the Republic of Tuva. I. Epidemiology of hearing impairments in the Republic of Tuva. *Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow)*. 2014b;13(1):17-26.
- Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A., Teryutin F.M., Posukh O.L., Fedotova E.E., Lobov S.L., Khusnutdinova E.K. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in *GJB2* gene as a result of founder effect. *J. Hum. Genet.* 2011;56:631-639. DOI 10.1038/jhg.2011.72
- Ben Arab S., Masmoudi S., Beltaief N., Hachicha S., Ayadi H. Consanguinity and endogamy in Northern Tunisia and its impact on non-syndromic deafness. *Genet. Epidemiol.* 2004;27:74-79. DOI 10.1002/gepi.10321
- Bender R. The conquest of deafness: a history of the long struggle to make possible normal living to those handicapped by lack of normal hearing. 3rd ed.: Danville, Ill.: Interstate Printers & Publishers, 1981.
- Blanton S.H., Nance W.E., Norris V.W., Welch K.O., Burt A., Pandya A., Arnos K.S. Fitness among individuals with early childhood deafness: Studies in alumni families from Gallaudet University. *Ann. Hum. Genet.* 2010;74(1):27-33. DOI 10.1111/j.1469-1809.2009.00553.x
- Bliznets E.A., Galkina V.A., Matiushchenko G.N., Kisina A.G., Markova T.G., Poliakov A.V. Changes in the connexin 26 (*GJB2*) gene in Russian patients with hearing disorders: results of long-term molecular diagnostics of hereditary nonsyndromic deafness. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2012;48(1):112-124.
- Bozhkova V.P., Khashaev Z.Kh., Magomedov Sh.M. The study of inherited hearing loss for the children from Republic Dagestan. *Fundamentalnye Issledovaniya=Fundamental Research*. 2011;5:23-27.
- Brobby G.W., Müller-Muhsok B., Horstmann R.D. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N. Engl. J. Med.* 1998;19(338):548-550. DOI 10.1056/NEJM199802193380813
- Brownstein Z., Friedman L.M., Shahin H., Oron-Karni V., Kol N., Abu Rayyan A., Parzefall T., Lev D., Shalev S., Frydman M., Davidov B., Shohat M., Rahile M., Lieberman S., Levy-Lahad E., Lee M.K., Shomron N., King M.C., Walsh T., Kanaan M., Avraham K.B. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in middle eastern families. *Genome Biol.* 2011;12(9):R89. DOI 10.1186/gb-2011-12-9-r89
- Carlsson P.I., Danermark B., Borg E. Marital status and birthrate of deaf people in two Swedish counties: the impact of social environment in terms of deaf community. *Am. Ann. Deaf.* 2004/2005;149(5): 415-420.
- Chaabani H., Ben Arab S., Chebbi K. Genetic heterogeneity study of non-syndromic autosomal recessive sensorineural deafness within the Tunisian population. *Ann. Genet.* 1995;38:158-161.
- Christiansen J.B. Sociological implications of hearing loss. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1991;630:230-235. DOI 10.1111/j.1749-6632.1991.tb19592.x
- Dai P., Yu F., Han B., Liu X., Wang G., Li Q., Yuan Y., Liu X., Huang D., Kang D., Zhang X., Yuan H., Yao K., Hao J., He J., He Y., Wang Y., Ye Q., Yu Y., Lin H., Liu L., Deng W., Zhu X., You Y., Cui J., Hou N., Xu X., Zhang J., Tang L., Song R., Lin Y., Sun S., Zhang R., Wu H., Ma Y., Zhu S., Wu B.L., Han D., Wong L.J. *GJB2* mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. *J. Transl. Med.* 2009;7:26. DOI 10.1186/1479-5876-7-26
- Diaz-Horta O., Duman D., Foster J., Sirmaci A., Gonzalez M., Mahdieh N., Fotouhi N., Bonyadi M., Cengiz F.B., Menendez I., Ulloa R.H., Edwards Y.J., Züchner S., Blanton S., Tekin M. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PLoS One*. 2012;7(11):e50628. DOI 10.1371/journal.pone.0050628
- Di Rienzo A., Hudson R.R. An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model. *Trends Genet.* 2005; 21(11):596-601. DOI 10.1016/j.tig.2005.08.007
- Du W., Guo Y., Wang C., Wang Y., Liu X. A systematic review and meta-analysis of common mutations of *SLC26A4* gene in Asian populations. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2013;77(10):1670-1676. DOI 10.1016/j.ijporl.2013.07.023
- Ethnologue: Languages of the World, Eds. Lewis M.P., Simons G.F., Fennig C.D. 18th ed. Dallas, Texas: SIL International. Available at <http://www.ethnologue.com>. 2015.
- Fay E.A. Marriages of the Deaf in America. Washington, DC: Volta Bureau, 1898.
- Ferrer P. Systems biology and biological systems diversity for the engineering of microbial cell factories. *Microb. Cell Fact.* 2007;6:35. DOI 10.1186/1475-2859-6-35.
- Ferrer J., Prats C., López D. Individual-based modelling: an essential tool for microbiology. *J. Biol. Phys.* 2008;34(1-2):19-37. DOI 10.1007/s10867-008-9082-3

- Gasparini P., Rabionet R., Barbuji G., Melzhionda S., Petersen M., Bruundum-Nielsen K., Metspalu A., Oitmaa E., Pisano M., Fortina P., Zelante L., Estivill X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG. Eur. J. Hum. Genet. 2000;8:19-23.
- Groce N.E. Everyone here spoke sign language: hereditary deafness on Martha's Vineyard. Cambridge, Massachusetts, Harvard Univ. Press, 1985.
- Hamelmann C., Amedofu G.K., Albrecht K., Muntau B., Gelhaus A., Brobby G.W., Horstmann R.D. Pattern of connexin 26 (*GJB2*) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. Hum. Mutat. 2001;18:84-85. DOI 10.1002/humu.1155
- Hethcote H.W. The mathematics of infectious diseases. SIAM Rev. 2006;42(4):599-653. DOI 10.1137/S0036144500371907
- Hoban S., Bertorelle G., Gaggiotti O.E. Computer simulations: tools for population and evolutionary genetics. Nat. Rev. Genet. 2012;13(2):110-122. DOI 10.1038/nrg3130
- Hu D.N., Qiu W.Q., Wu B.T., Fang L.Z., Zhou F., Gu Y.P., Zhang Q.H., Yan J.H. Prevalence and genetic aspects of deaf mutism in Shanghai. J. Med. Genet. 1987;24:589-592.
- Khidiiatova I.M., Dzhemileva L.U., Khabibullin R.M., Khusnutdinova E.K. Frequency of the 35delG mutation of the connexin 26 gene (*GJB2*) in patients with non-syndromic autosomal-recessive deafness from Bashkortostan and in ethnic groups of the Volga-Ural region. Molekulyarnaya Biologiya=Molecular Biology (Moscow). 2002;36(3):438-441.
- Lee K.Y., Choi S.Y., Bae J.W., Kim S., Chung K.W., Drayna D., Kim U.K., Lee S.H. Molecular analysis of the *GJB2*, *GJB6* and *SLC26A4* genes in Korean deafness patients. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2008;72(9):1301-1309. DOI 10.1016/j.ijporl.2008.05.007
- Lerer I., Sagi M., Malamud E., Levi H., Raas-Rothschild A., Abeliovich D. Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. Am. J. Med. Genet. 2000;95(1):53-56. DOI 10.1002/1096-8628(20001106)95:1<53::AID-AJMG11>3.0.CO;2-2
- Lezirovitz K., Pardono E., de Mello Auricchio M.T., de Carvalho E., Silva F.L., Lopes J.J., Abreu-Silva R.S., Romanos J., Batisso A.C., Mingroni-Netto R.C. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. Eur. J. Hum. Genet. 2008;16(1):89-96. DOI 10.1038/sj.ejhg.5201917
- Liu X.Z., Xia X.J., Ke X.M., Ouyang X.M., Du L.L., Liu Y.H., Angeli S., Telischi F.F., Nance W.E., Balkany T., Xu L.R. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. Hum. Genet. 2002;111:394-397. DOI 10.1007/s00439-002-0811-6
- Liu X., Xu L., Zhang S., Xu Y. Epidemiological and genetic studies of congenital profound deafness in the general population of Sichuan, China. Am. J. Med. Genet. 1994;53(2):192-195.
- Marazita M.L., Ploughman L.M., Rawlings B., Remington E., Arnos K.S., Nance W.E. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. Am. J. Med. Genet. 1993;46:486-491.
- Markova T.G., Megrelishvili S.M., Zaitseva N.G., Shagina I.A., Poliakov A.V. DNA diagnosis in congenital and early childhood hypoacusis and deafness. Vestnik Otorinolaringologii=Bulletin of Otorhinolaryngology. 2002;6:12-15.
- Markova T.G., Poliakov A.V., Kunelskaia N.L. Clinical picture of hearing defects caused by Cx26 gene mutations. Vestnik Otorinolaringologii=Bulletin of Otorhinolaryngology. 2008;2:4-9.
- Martins M.L., Ferreira S.C., Vilela M.J. Multiscale models for biological systems. Curr. Opin. Colloid & Interface Sci. 2010;15(1-2):18-23. DOI 10.1016/j.cocis.2009.04.004
- Middleton A., Hewison J., Mueller R.F. Attitudes of deaf adults toward genetic testing for hereditary deafness. Am. J. Hum. Genet. 1998;63:1175-1180. DOI 10.1086/302060
- Middleton A., Hewison J., Mueller R. Prenatal diagnosis for inherited deafness – What is the potential demand? J. Genet. Couns. 2001;10:121-131.
- Morell R.J., Kim H.J., Hood L.J., Goforth L., Friderici K., Fisher R., Van Camp G., Berlin C.I., Oddoux C., Ostrer H., Keats B., Friedman T.B. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. N. Engl. J. Med. 1998;339:1500-1505. DOI 10.1056/NEJM199811193392103
- Morton C.C., Nance W.E. Newborn hearing screening – a silent revolution. N. Engl. J. Med. 2006;354(20):2151-2164. DOI 10.1056/NEJMra050700
- Mossong J., Hens N., Jit M., Beutels P., Auranen K., Mikolajczyk R., Edmunds W.J. Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. PLoS Med. 2008;5(3):e74. DOI 10.1371/journal.pmed.0050074
- Nance W.E. The genetics of deafness. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2003;9(2):109-119.
- Nance W.E., Liu X.Z., Pandya A. Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness. Lancet. 2000;356(9228):500-501. DOI 10.1016/S0140-6736(00)02565-4
- Nance W.E., Kearsey M.J. Relevance of connexin deafness (DFNB1) to human evolution. Am. J. Hum. Genet. 2004;74(6):1081-1087. DOI 10.1086/420979
- Nekrasova N.Y., Shagina I.A., Petrin A.N., Polyakov A.V. The frequency of mutation 35delG in the connexin 26 gene in children with early childhood sensorineural hearing loss. Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow). 2002;1(6):290-294.
- Ohtsuka A., Yuge I., Kimura S., Namba A., Abe S., Van Laer L., Van Camp G., Usami S. *GJB2* deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. Hum. Genet. 2003;112:329-333. DOI 10.1007/s00439-002-0889-x
- Osetrova A.A., Sharonova Ye.I., Rossinskaya T.G., Galkina V.A., Zinchenko R.A. Investigation of genetic aspects of congenital and early childhood deafness in specialized schools for children with impaired hearing of Kirov region, Russia. Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow). 2010;9:30-40.
- Padden C., Humphries T. Deaf in America: voices from a culture. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press, 1988.
- Park H.J., Hahn S.H., Chun Y.M., Park K., Kim H.N. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. Laryngoscope. 2000;110(9):1535-1538. DOI 10.1097/00005537-200009000-00023
- Park H.J., Shaukat S., Liu X.Z., Hahn S.H., Naz S., Ghosh M., Kim H.N., Moon S.K., Abe S., Tukamoto K., Riazuddin S., Kabra M., Erdenetungalag R., Radnaabazar J., Khan S., Pandya A., Usami S.I., Nance W.E., Wilcox E.R., Riazuddin S., Griffith A.J. Origins and frequencies of *SLC26A4* (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. J. Med. Genet. 2003;40(4):242-248. DOI 10.1136/jmg.40.4.242
- Peng B., Amos C.I., Kimmel M. Forward-time simulations of human populations with complex diseases. PLoS Genet. 2007;3(3):e47. DOI 10.1371/journal.pgen.0030047
- Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V., Osipova L., Claustres M., Roux A.F. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population. BMC Med. Genet. 2005;6(1):12. DOI 10.1186/1471-2350-6-12
- Prezioso C.T. Cultural aspects of deafness (the Deaf community). Ed. J. Israel. An Introduction to Deafness: a Manual for Genetic Counselors. Washington DC: Gallaudet Research Institute, Gallaudet Univ., 1995.
- Prozorova E.V. Russian sign language as a subject of linguistic research. Voprosy Yazykoznaniya=Topics in the Study of Language. 2007;1:44-61.
- Pshennikova V.G., Barashkov N.A., Teryutin F.M., Solovyev A.V., Klarov L.A., Romanov G.P., Gotovtsev N.N., Savvinova K.E., Kozhevnikov A.A., Sidorova O.G., Vasilyeva L.M., Fedotova E.E., Morozov I.V., Bondar A.A., Solovyova N.A., Kononova S.K., Raifailov A.M., Sazonov N.N., Alekseev A.N., Posukh O.L., Dzhemileva L.U., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A. *GJB2* mutation spectrum in patients with congenital hearing loss in Yakutia. Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow). 2015;6:10-21.
- Puzryev V.P., Erdyniyeva L.S., Kucher A.N., Nazarenko L.P. Genetiko-epidemiologicheskoe issledovanie naseleniya Tuvy [Genetic epidemiological study of the Tyva population]. Tomsk, STT, 1999.

- Qu Z., Garfinkel A., Weiss J. N., Nivala M. Multi-scale modeling in biology: how to bridge the gaps between scales? *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 2011;107(1):21-31. DOI 10.1016/j.pbiomolbio.2011.06.004
- Rabionet R., Zelante L., López-Bigas N., D'Agruma L., Melchionda S., Restagno G., Arbonés M.L., Gasparini P., Estivill X. Molecular bases of childhood deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene. *Hum. Genet.* 2000;106:40-44. DOI 10.1007/s004399900192
- RamShankar M., Girirajan S., Dagan O., Ravi Shankar H.M., Jalvi R., Rangasayee R., Avraham K.B., Anand A. Contribution of connexin26 (*GJB2*) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J. Med. Genet.* 2003;40:e68. DOI 10.1136/jmg.40.5.e68
- Rapin I. Consequences of congenital hearing loss: A long-term view. *J. Otolaryngol.* 1978;7(6):473-483.
- Rose S.P. Genetic Studies of Profound Prelingual Deafness. PhD Thesis (Indiana Univ.). 1975.
- Ruben R.J. The history of the genetics of hearing impairment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1991;630:6-15. DOI 10.1111/j.1749-6632.1991.tb19571.x
- Sattenspiel L., Dietz K. A structured epidemic model incorporating geographic mobility among regions. *Math. Biosci.* 1995;128(1-2): 71-91. DOI 10.1016/0025-5564(94)00068-B
- Schein J. The Deaf community. Eds H. Davis, S.R. Silverman. *Hearing and Deafness*. 4th ed. N.Y.: Holt, Rinehart, Winston, 1978.
- Schein J., Delk M. The Deaf Population of the United States. Silver Spring, MD: National Association of the Deaf, 1974.
- Scott D.A., Carmi R., Elbedour K., Duyk G.M., Stone E.M., Sheffield V.C. Nonsyndromic autosomal recessive deafness is linked to the DFNB1 locus in a large inbred Bedouin family from Israel. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;57:965-968.
- Sharonova E.I., Osetrova A.A., Zinchenko R.A. Hereditary hearing loss in the Kirov region. *Yakutskiy Meditsinskiy Zhurnal=Yakut Medical Journal.* 2009;2(29):28-31.
- Shokarev R.A., Amelina S.S., Kriventsova N.V., Khlebnikova O.V., Bliznetz E.A., Polyakov A.V., Zinchenko R.A. Genetic-epidemiological and molecular-genetic study of hereditary deafness in the Rostov province. *Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow).* 2005;4(12):556-567.
- Sirmaci A. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clin. Genet.* 2009;75(6):562-567. DOI 10.1111/j.1399-0004.2009.01183.x
- Sirmaci A., Edwards Y.J., Akay H., Tekin M. Challenges in whole exome sequencing: an example from hereditary deafness. *PLoS One.* 2012;7(2):e32000. DOI 10.1371/journal.pone.0032000
- Stenson P.D., Mort M., Ball E.V., Shaw K., Phillips A., Cooper D.N. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* 2014;133(1):1-9. DOI 10.1007/s00439-013-1358-4
- Stern S.J., Arnos K.S., Murrelle L., Welch K.O., Nance W.E., Pandya A. Attitudes of Deaf and hard of hearing subjects toward genetic testing and prenatal diagnosis of hearing loss. *J. Med. Genet.* 2002;39:449-453. DOI 10.1136/jmg.39.6.449
- Tarskaia L.A., Zinchenko R.A., Elchinova G.I., Egorova A.G., Korotov M.N., Basova E.V., Prokopenko A.M., Sivtseva E.N., Nikolaeva E.E., Banskchinkova E.S., Samarkina M.V., Sannikova A.N., Danilova G.I., Zhelobtsova A.F., Danilova A.P., Popova G.N. The structure and diversity of hereditary pathology in Sakha Republic (Yakutia). *Genetika=Genetics (Moscow).* 2004;40(11):1530-1539.
- Tekin M., Arici Z.S. Genetic epidemiological studies of congenital/prelingual deafness in Turkey: population structure and mating type are major determinants of mutation identification. *Am. J. Med. Genet. A.* 2007;143A:1583-1591. DOI 10.1002/ajmg.a.31702
- Tekin M., Xia X.J., Erdenetungalag R., Cengiz F.B., White T.W., Radnaabazar J., Dangaasuren B., Tastan H., Nance W.E., Pandya A. *GJB2* mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf. *Ann. Hum. Genet.* 2010;74(2):155-164. DOI 10.1111/j.1469-1809.2010.00564.x
- Toriello H.V., Smith S.D. *Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes/Third Edition.* USA Oxford Monographs on Medical Genetics, 2013.
- Tsukamoto K., Suzuki H., Harada D., Namba A., Abe S., Usami S. Distribution and frequencies of PDS (*SLC26A4*) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur. J. Hum. Genet.* 2003;11:916-922. DOI 10.1038/sj.ejhg.5201073
- Twycross J., Band L.R., Bennett M.J., King J.R., Krasnogor N. Stochastic and deterministic multiscale models for systems biology: an auxin-transport case study. *BMC Systems Biol.* 2010;4(1):34. DOI 10.1186/1752-0509-4-34
- Van Camp G., Smith R.J.H. Hereditary Hearing Loss Homepage. Available at <http://hereditaryhearingloss.org>, last update: May 13th, 2015.
- Van Laer L., Coucke P., Mueller R.F., Caethoven G., Flothmann K., Prasad S.D., Chamberlin G.P., Houseman M., Taylor G.R., Van de Heyning C.M., Fransen E., Rowland J., Cucci R.A., Smith R.J., Van Camp G. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J. Med. Genet.* 2001;38(8):515-518. DOI 10.1136/jmg.38.8.515
- Wattanasirichaigoon D., Limwongse C., Jariengprasert C., Yenchtisomanus P.T., Tocharoenthanaphol C., Thongnoppakhun W., Thawil C., Charoenpipop D., Pho-iam T., Thongpradit S., Duggal P. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (*GJB2*) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals. *Clin. Genet.* 2004;66(5):452-460. DOI 10.1111/j.1399-0004.2004.00325.x
- Winata S., Arhya I.N., Moeljopawiro S., Hinnant J.T., Liang Y., Friedman T.B., Asher J.H.Jr. Congenital non-syndromal autosomal recessive deafness in Bengkala, an isolated Balinese village. *J. Med. Genet.* 1995;32(5):336-343.
- Zhuravskiy S.G., Ivanov S.A., Taraskina A.E., Grinchik O.V., Kurus A.A. Prevalence of *GJB2* gene mutation 35delG among healthy population of Northwest Region of Russia. *Meditsinskiy Akademicheskii Zhurnal=Medical Academic Journal.* 2009;9(2):41-45.
- Zinchenko R.A., Elchinova G.I., Osipova E.V., Petrova N.V., Ginter E.K. Population Genetics of Hereditary Diseases in the Udmurt Republic. *Vestnik Udmurtskogo Universiteta=Bulletin of Udmurt University.* 2009a;1:43-57.
- Zinchenko R.A., Galkina V.A., Bessonova L.A., Dadali E.L., Khlebnikova O.V., Mikhailova L.K., Kadishev V.V., Petrin A.N., Sharonova E.I., Vafina Z.I., Elkanova L.A., Havrilina S.G., Bolotov V.A., Polyakov A.V., Strelnikov V.V., Zacharova E.U., Zaletaev D.V., Ginter E.K. Medical-genetic study of the Tatarstan Republic. II. Diversity of hereditary diseases in three Districts of Republic Kazan-Tatar. *Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow).* 2012a;9:31-40.
- Zinchenko R.A., Murzabaeva S.Sh., Grinberg Ia.I., Galkina V.A., Khlebnikova O.V., Dadali E.L., Fedotov V.P., Khidiyatova I.M., Khusnutdinova E.K., Ginter E.K. Genetic epidemiological study of Bashkortostan Republic: the diversity of monogenic hereditary diseases in five districts. *Genetika=Genetics (Moscow).* 2009b;45(5):677-690.
- Zinchenko R.A., Osetrova A.A., Sharonova E.I., Elchinova G.I. Hereditary deafness in Kirov oblast: a genetic epidemiological study. *Genetika=Genetics (Moscow).* 2012b;48(3):381-388.
- Zinchenko R.A., Zinchenko S.P., Galkina V.A., Elchinova G.I., Nurbaev S.D., Poliakov A.V., Nekrasova N.U., Ginter E.K. Prevalence and molecular-genetic typing of nonsyndromic sensorineural deafness in the Chuvash Republic. *Genetika=Genetics (Moscow).* 2003;39(9):1275-1284.
- Zinchenko S.P., Kirillov A.G., Abrukova A.V., Sorokina T.V., Sharonova E.I., Khidiyatova I.M., Jemileva L.U., Shokarev R.A., Bliznetz E.A., Khusnutdinova E.K., Zinchenko R.A., Ginter E.K. Epidemiological study of hereditary hearing loss (nonsyndromal and syndromal) in Chuvashia Republic. *Meditsinskaya Genetika=Medical Genetics (Moscow).* 2007;6(5):18-28.

Полиморфизм гена цитохрома *P450 CYP1A1* (*ILE462VAL*) в популяциях тундровых ненцев Ямало-Ненецкого автономного округа, нганасан Таймыра и русских Сибири

Р.П. Тийс¹, Л.П. Осипова^{1,2}, Т.В. Чуркина¹, Л.Э. Табиханова¹, Д.В. Личман^{1,2}, Е.Н. Воронина^{2,3}, М.Л. Филипенко^{2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Был исследован полиморфизм гена цитохрома *P450 CYP1A1* – вариант *CYP1A1*2C* (*Ile462Val*, rs1048943). В результате этой замены активность фермента повышается в два раза, что приводит к накоплению реактивных интермедиатов и резко увеличивает возможность мутационных изменений ДНК и химически индуцируемого канцерогенеза. Известно, что носительство варианта *462Val* может являться фактором риска развития ряда онкологических и других мультифакториальных заболеваний. Исследование проведено в популяциях тундровых ненцев Пуровского района Ямало-Ненецкого автономного округа ($n = 271$), нганасан Таймыра ($n = 186$) и русских, проживающих на севере Сибири ($n = 267$). В изученных выборках отсутствовали потомки от смешанных браков. Генотипирование проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Частота варианта *462Val* в выборке тундровых ненцев составила 23,8 % (95 %-й доверительный интервал 20,4–27,6 %), что соответствует диапазону частот, встречающихся в популяциях восточной Азии, и выше значений, характерных для европеоидных популяций. В выборке русских Сибири частота аллеля *462Val* составила 5,8 % (95 %-й доверительный интервал 4,1–8,1 %), что соответствует частоте этого варианта в европеоидных популяциях. В выборке нганасан частота варианта *462Val* составила 39,0 % (95 %-й доверительный интервал 34,2–44,0 %) – это достоверно выше частот, характерных для популяций Европы, Африки и Азии. Близкими к нганасанам по частоте аллеля *462Val* оказались лишь эскимосы (инуиты) Гренландии, индейцы Америки, а также южные китайцы. Таким образом, в популяциях тундровых ненцев и нганасан аллель *CYP1A1 462Val* встречается с высокой частотой, превышающей значения, характерные для европеоидных популяций. Широкое распространение данного варианта может указывать на наличие популяционного риска развития заболеваний, в патогенезе которых принимает участие данный генетический полиморфизм, особенно при изменениях традиционного уклада жизни, заключающегося в проникновении в среду обитания северных этносов ранее не встречающихся экотоксикантов.

Ключевые слова: тундровые ненцы; нганасаны; русские; ПЦР в режиме реального времени; ксенобиотики; *CYP1A1 Ile462Val*.

The *ILE462VAL* polymorphism of the cytochrome *P450 CYP1A1* gene among Tundra Nenets in Yamalo-Nenets Autonomous Okrug, Nganasans in the Taimyr Peninsula and Russians in Siberia

R.P. Tiis¹, L.P. Osipova^{1,2}, T.V. Churkina¹, L.E. Tabikhanova¹, D.V. Lichman^{1,2}, E.N. Voronina^{2,3}, M.L. Filipenko^{2,3}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

The work concerns a polymorphism of the cytochrome *P450 CYP1A1* gene, the *CYP1A1*2C* variant (*Ile462Val*, rs1048943). This substitution results in a two-fold increase in enzyme activity, which leads to accumulation of active intermediates and increases the risk of DNA mutations and chemically induced carcinogenesis. It has been demonstrated that the *462Val* allele may be a risk factor in some oncological and other multifactorial diseases. This study was performed on Tundra Nenets in Yamalo-Nenets Autonomous Okrug ($N = 271$), Nganasans in the Taimyr Peninsula ($N = 186$) and Russians in North Siberia ($N = 267$). The cohorts did not include descendants of mixed marriages. Genotyping was performed using Real-Time PCR with competitive TaqMan allele-specific probes. The frequency of the *462Val* allele in the Tundra Nenets cohort was 23.8 % (95 % CI 20.4–27.6 %), which corresponds to the frequency range found in East Asian populations and is higher than the values typical of European populations. The *462Val* allele frequency in the Russian cohort was 5.8 % (95 % CI 4.1–8.1 %), which corresponds to the frequency range of European populations. The *462Val* allele frequency in the Nganasans cohort was 39.0 % (95 % CI 34.2–44.0 %), which is higher than the frequencies found in European, Asian and African populations. Frequencies of the

462Val variant close to that in Nganasans have been observed in Greenland Inuits, native Americans as a whole and the Southern Chinese. A high-frequency occurrence of the 462Val allele among Tundra Nenets and Nganasans may be indicative of a population-wide risk of diseases influenced by this genetic polymorphism, especially when traditional mainstays are gone or previously unknown ecotoxicants appear in the areas.

Key words: Tundra Nenets; Nganasans; Russians; xenobiotics; real-time PCR; *CYP1A1 Ile462Val*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Тийс Р.П., Осипова Л.П., Чуркина Т.В., Табиханова Л.Э., Личман Д.В., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. Полиморфизм гена цитохрома *P450 CYP1A1 (Ile462Val)* в популяциях тундровых ненцев Ямало-Ненецкого автономного округа, нганасан Таймыра и русских Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):16-22. DOI 10.18699/VJ16.102

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Tiis R.P., Osipova L.P., Churkina T.V., Tabikhanova L.E., Lichman D.V., Voronina E.N., Filipenko M.L. The *Ile462Val* polymorphism of the cytochrome *P450 CYP1A1* gene among Tundra Nenets in Yamalo-Nenets Autonomous Okrug, Nganasans in the Taimyr Peninsula and Russians in Siberia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):16-22. DOI 10.18699/VJ16.102

В среде обитания человека попадают новые химические вещества (ксенобиотики), многие из которых являются потенциальными канцерогенами и мутагенами. В связи с этим они могут рассматриваться в качестве серьезных факторов, способствующих развитию ряда онкологических и других мультифакториальных заболеваний (Гуляева, Райс, 2005). Важнейшую роль в защите организма от этих вредных веществ играют ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков (СБК). Среди главных представителей СБК выделяется семейство цитохромов P450 (CYP), которые не только защищают организм человека от большого разнообразия ксенобиотиков, но и принимают участие в метаболизме эндогенных веществ (гормонов, медиаторов воспаления и др.) (Саприн, 1991; Баранов и др., 2000; Гичев, 2002; Nebert, Dalton, 2006; Rendic, Guengerich, 2012). Гены ферментов СБК высокополиморфны, что является одной из причин различий индивидов в их устойчивости или чувствительности к воздействию неблагоприятных внешних факторов (ксенобиотиков, ионизирующего излучения и др.) и, следовательно, в предрасположенности к развитию заболеваний, включая онкологические (Garte et al., 2001; Иващенко и др., 2003; Li et al., 2004; Vayapati et al., 2005; Жученко и др., 2006; Ляхович и др., 2006; Androutsopoulos et al., 2009; Rendic, Guengerich, 2012).

Цитохром CYP1A1 представляет особый интерес для изучения в связи с тем, что метаболизирует такие опасные вещества-канцерогены, как диоксины (образуются при производстве гербицидов, сжигании отходов производства; источником является также целлюлозно-бумажная промышленность) и полициклические ароматические углеводороды (бенз(а)пирен), образующиеся при сжигании нефтепродуктов, мусора, приготовлении жареной пищи, содержащиеся в табачном дыме (Hasler et al., 1999; Shimada, Fujii-Kuriyama, 2004; Zhang et al., 2006).

В гене *CYP1A1* было описано несколько аллельных вариантов (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>). В данной работе мы остановимся на изучении варианта *CYP1A1*2C* (rs1048943), заключающегося в транзиции аденина на гуанин в положении 2455 в 7-м экзоне гена. Эта транзиция приводит к замене изолейцина на валин

в аминокислотной последовательности каталитического центра фермента (*Ile462Val*). В результате продуцируется фермент с активностью в два раза выше, чем у фермента без замены, и высокая каталитическая активность приводит к накоплению реактивных интермедиатов, что резко увеличивает возможность мутационных изменений ДНК и химически индуцируемого канцерогенеза, в связи с чем полиморфный вариант *462Val* рассматривают в качестве фактора риска для развития ряда мультифакториальных заболеваний. К примеру, было показано, что наличие аллельного варианта *462Val* значительно повышает риск развития рака почек (Chen et al., 2011), легкого (Butkiewicz et al., 1999; London et al., 2000; Chen et al., 2001; Xue et al., 2001; Hung et al., 2003), мочевого пузыря (Измайлов и др., 2011), рака полости рта (Hahn et al., 2002; Marques et al., 2006), рака желудка (Севостьянова и др., 2009), лейкемии (Taspinar et al., 2008; Razmkhah et al., 2011), острой лейкобластной анемии (Joseph et al., 2004; Gallegos-Arreola et al., 2004). Присутствие в геноме хотя бы одного аллеля *462Val* гена *CYP1A1* приводит к значимому повышению частоты клеток с хромосомными aberrациями (Минина и др., 2009). Цитохром P450 1A1 также участвует в патогенезе такого тяжелого наследственного заболевания, как муковисцидоз, а также хронических заболеваний дыхательной системы (Корытина и др., 2003).

Исследования распространенности варианта *CYP1A1 462Val* проведены на множестве мировых популяций. По литературным данным (см. табл. 2, (The 1000 Genomes ..., 2012; www.1000genomes.org)), наименьшая частота аллеля *CYP1A1 462Val* наблюдается в популяциях Африки (0–3 %, у афроамериканцев – до 6 %). У народов Европы данный вариант также встречается довольно редко (2–7 %). Чуть выше частота аллеля *462Val* в популяциях Южной Азии (10–14 %). В Восточной Азии данный вариант встречается гораздо чаще (19–33 %), и самая высокая его частота наблюдается у индейцев Америки (14–71 %, в среднем 35 %) и эскимосов (инуитов) Гренландии (46 %). Максимальная частота аллеля *462Val* (71 %) зарегистрирована в выборке из Перу.

Данные о распространенности варианта *CYP1A1 462Val* в популяциях коренного населения Сибири крайне скудны

(Дужак и др., 1998). Коренные народы Северной Сибири характеризуются общим типом хозяйственной деятельности в виде охоты, рыболовства, оленеводства. Они ведут кочевой или полукочевой образ жизни, в питании их преобладают продукты животного происхождения (Sukernik et al., 1978; Карафет и др., 1994). Они живут в экстремальных климатических условиях, сохраняя традиционный образ жизни. С промышленным освоением Севера началось загрязнение природной среды. Экологические проблемы приобретают для народов Севера особую остроту, так как природная среда для них является основой существования.

С учетом большой роли *CYP1A1* в патогенезе онкологических и других серьезных мультифакториальных заболеваний целью нашего исследования было изучение распространения замены *CYP1A1 Ile462Val* в популяциях этнически чистых тундровых ненцев и нганасан. Для сравнения была исследована выборка русских Севера Сибири и проведена работа с литературными данными относительно распространенности *CYP1A1 Ile462Val* в других мировых популяциях.

Материалы и методы

Исследовали выборку ДНК ($n = 271$) тундровых ненцев, одного из самых многочисленных коренных народов российского Севера. Они являются типичными представителями самодийского этноса. По антропологическим и генетическим данным, в генофонде тундровых ненцев представлены как монголоидная, так и европеоидная компоненты (Осипова, 1994; Осипова и др., 1996). Выборка ненцев состояла из коренных жителей Самбургской тундры (общая численность около 2 тыс. человек) Пуровского района Ямало-Ненецкого автономного округа. Мы не исследовали выборку метисов разных уровней от браков коренных жителей с русскими и другими пришлыми этносами.

Вторая выборка была составлена из этнически чистых представителей нганасан ($n = 186$) из поселков Усть-Авам и Волочанка Дудинского района Красноярского края. Они являются самым северным народом Евразии, потомками древнего палеоазиатского населения и неолитических охотников на дикого северного оленя, смешавшегося в недавнем прошлом с самодийскими и тунгусскими племенами (Долгих, 1952; Симченко, 1976). Генофонд нганасан по классическим маркерам крови является «эталонным» для северных монголоидов (Сукерник и др., 1977; Osipova, Sukernik, 1983). Однако впоследствии, по данным изучения митохондриальной ДНК, в этой этнической группе было обнаружено наличие древне-европеоидной гаплогруппы U4, полученной в результате брачных миграций от соседних кочевых групп самодийцев – ненцев и энцев (Дербенева и др., 2002; Гольцова и др., 2005). Численность нганасан невелика – всего 862 человека – по данным переписи населения 2010 г. В настоящее время этот этнос подвержен существенным процессам ассимиляции с долганами и пришлым европеоидным населением.

Третья выборка состоит из русских, проживающих на севере Сибири ($n = 267$). Материал для исследования был собран во время экспедиций 1988–2013 гг. на Ямал и Таймыр под руководством кандидата биологических

наук Л.П. Осиповой. Забор крови производился у добровольцев, практически здоровых на момент исследования, по международным правилам, с использованием «Информированного согласия» и с одобрения Комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Образцы ДНК были выделены из лейкоцитарных фракций венозной крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции с применением протеиназы К (Sambrook et al., 1989). Генотипирование однонуклеотидной замены *A2455G (CYP1A1*2C, Ile462Val)* в гене *CYP1A1* проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Каждый образец амплифицировали с использованием пары праймеров и двух зондов, несущих «гаситель» на 3'-конце и разные флюоресцентные красители (FAM либо R6G) на 5'-конце. Последовательности праймеров и зондов были следующими: 5'-agtgagaaggtgattatcttgg-3'; 5'-agcagatagccaggaagag-3' и 5'-FAM-tgagaccattgcccgctg-BHQ-3'; 5'-R6G-tgagaccgttgcscgctg-BHQ-3', соответственно. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала ДНК с концентрацией 15 нг/мкл, 300 нМ каждого праймера; по 100–200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ dNTPs; амплификационный буфер (650 мМ Tris-HCl, 240 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 % Tween 20, 35 мМ MgCl_2); Taq-полимеразу. ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация в течение 1 мин 30 с при 96 °C; затем 45 циклов, включающих денатурацию при 96 °C 8 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 62 °C в течение 40 с (каждый шаг сопровождался регистрацией флюоресцентного сигнала в диапазоне, соответствующих интервалам флюоресценции флюорофоров FAM и R6G). Работа проводилась с использованием амплификатора iCycler iQ 4 (Bio-Rad, США). Полученные данные обрабатывались с помощью программы «Bio-Rad iQ5».

Популяционные частоты аллельных вариантов вычисляли на основе наблюдаемых частот генотипов. Доверительные интервалы для частот рассчитывали по формуле Уилсона (Wilson, 1927). Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона (при $p > 0,05$ равновесие выполняется). Для оценки достоверности различий в частотах аллелей между популяционными выборками был применен критерий χ^2 с поправкой Йейтса (при $p < 0,05$ различия считались статистически значимыми).

Результаты

Распределение генотипов полиморфного локуса *CYP1A1 Ile462Val* было изучено в образцах ДНК 271 тундровых ненцев, 186 нганасан, и 267 русских. Во всех исследованных выборках распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди–Вайнберга (табл. 1). Результаты собственного исследования и литературные данные о встречаемости варианта *CYP1A1 462Val* в некоторых популяциях человека, а также достоверность межпопуляционных различий приведены в табл. 1 и 2.

Учитывая, что генофонд тундровых ненцев имеет в своем составе монголоидную и европеоидную компоненты (Осипова и др., 1996), а нганасан – в основном монголо-

Table 1. Distribution of genotypes for SNP *CYP1A1 Ile462Val* (rs 1048943) in Nganasans, Tundra Nenets, and Russians in northern Siberia

Population	N	Distribution of genotypes for <i>CYP1A1 Ile462Val</i>			462Val allele frequency (95 % CI)	Deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, <i>p</i>
		AA (Ile/Ile)	AG (Ile/Val)	GG (Val/Val)		
Nganasans	186	63 (33.9 %)	101 (54.3 %)	22 (11.8 %)	39.0 % (34.2–44.0 %)	0.054
Tundra Nenets	271	163 (60.2 %)	87 (32.1 %)	21 (7.8 %)	23.8 % (20.4–27.6 %)	0.058
Russians in Siberia	267	240 (89.9 %)	23 (8.6 %)	4 (1.5 %)	5.8 % (4.1–8.1 %)	0.549

идную (Сукерник и др., 1977), мы изучили литературные данные о частоте встречаемости варианта *CYP1A1*2C 462Val* в популяциях европеоидного и монголоидного происхождения (табл. 2) и сравнили с полученными нами результатами. Проанализировали также литературные данные для народов Африки и Америки.

Обсуждение результатов

В популяции русских Сибири частота аллеля *462Val* составила 5,8 % (95 %-й доверительный интервал 4,1–8,1 %), что в целом соответствует литературным данным о частоте этого варианта в европеоидных популяциях (табл. 2). Не обнаружено статистически значимых различий между нашей выборкой русских Сибири и выборками русских, шотландцев, финнов и итальянцев. Имеются статистически значимые различия с иберами Испании (частота 1,9 %) и собирательной выборкой европеоидов из проекта «1000 Genomes» (частота 3,5 %). Выборка русских Сибири также достоверно отличается от популяций Африки, Азии и Америки, за исключением выборки афроамериканцев из проекта «1000 Genomes», которая по частоте аллеля *462Val* оказалась близка к европеоидам.

В популяции тундровых ненцев частота варианта *462Val* составила 23,8 % (95 %-й доверительный интервал 20,4–27,6 %), что соответствует частотам, характерным для монголоидных популяций (табл. 2). Не обнаружено статистически значимых различий между выборкой тундровых ненцев и популяциями Восточной Азии (восточные азиаты в целом, китайцы хань, вьеты, японцы), кроме выборки южных китайцев (частота 32,9 %). Тундровые ненцы достоверно отличаются по частоте аллеля *462Val* от народов Южной Азии, Европы, Африки и Америки, близки к ним оказались только колумбийцы (частота 27 %).

Исследование локуса *CYP1A1 Ile462Val* среди тундровых ненцев впервые было проведено в 1998 г. сотрудниками нашей лаборатории на сравнительно небольшой выборке ($n = 102$). С помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов было показано, что частота аллеля *462Val* равна 34,8 % (Дужак и др., 1998). Для верификации полученных данных мы провели повторное исследование варианта *CYP1A1 Ile462Val* в увеличенной более чем в два раза выборке тундровых ненцев ($n = 271$), включив в нее и ранее исследованные образцы ДНК. Используя новый, более точный, метод ПЦР в режиме реального времени, мы получили сниженную частоту аллеля *462Val* (23,8 %), достоверно отличающуюся от

прежней ($p = 0,03$), что, вероятно, можно объяснить эффектом выборки в небольших популяциях, а также разницей в методиках.

Частота аллеля *CYP1A1 462Val* в выборке нганасан оказалась очень высокой – 39,0 % (95 %-й доверительный интервал 34,2–44,0 %) – это достоверно выше частот, характерных для популяций Европы, Африки и Азии. Близкими к нганасанам по частоте аллеля *462Val* оказались лишь южные китайцы из исследования Chen с коллегами (2011) (частота 32,9 %), мексиканцы (33,6 %) и индейцы Америки в целом (35,4 %). Близкая частота данного варианта (46 %, $p = 0,051$) зафиксирована в выборке эскимосов (инуитов) Гренландии (Ghisari et al., 2013).

Для эскимосов показана ассоциация замены *CYP1A1 Ile462Val* с содержанием в плазме крови некоторых стойких органических загрязнителей (persistent organic pollutants, POP), причем уровень данных веществ в крови эскимосов в несколько раз превышал значения, полученные на европейских популяциях (Ghisari et al., 2013). Основным источником органических загрязнителей для жителей Гренландии являются рыба и морские млекопитающие (феномен биоаккумуляции) (Bjerregaard et al., 2001). Показано также, что в выборке эскимосов аллель *462Val* ассоциирован с риском развития рака груди (Ghisari et al., 2014). Поскольку значительную часть рациона коренных жителей Сибири, как и эскимосов, составляет рыба, а также с учетом широкой распространенности аллеля *CYP1A1 462Val* в популяциях тундровых ненцев и нганасан, можно предположить, что в данных этнических группах также существует риск возникновения онкологических заболеваний, вызываемых некоторыми органическими загрязнителями – субстратами цитохрома *CYP1A1*.

Таким образом, в популяциях тундровых ненцев и нганасан аллель *462Val* встречается с высокой частотой, превышающей значения, характерные для европеоидных популяций. Эти коренные народы Севера проживали вдали от цивилизации в естественных природных условиях с минимальным содержанием вредных химических веществ (ксенобиотиков) в окружающей среде. Однако в настоящее время на территории их проживания происходит интенсивное развитие промышленности, что приводит к проникновению в среду обитания новых химических веществ, которые могут являться потенциальными канцерогенами. В связи с этим стоит принять во внимание, что довольно широкое распространение варианта *CYP1A1 Ile462Val* среди ненцев и нганасан может привести к по-

Table 2. Frequencies of allele CYP1A1*2C (2455G, 462Val) in some world populations (ethnic groups) and comparison of populations (*p*-value)

Population/ethnic group	N	462Val, allele frequency, %	Comparison of populations (<i>p</i> -value)		
			Nganasans	Tundra Nenets	Russians in Siberia
Siberia					
Nganasans*	173	39.0		<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Tundra Nenets*	271	23.8	<i>p</i> < 0.001		<i>p</i> < 0.001
Russians in Siberia*	267	5.8	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	
Africa					
Luhya, Kenya (LWK**, The 1000 Genomes..., 2012)	99	0.0	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
Yoruba, Nigeria (YRI**, The 1000 Genomes..., 2012)	108	0.0	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Africans in general (AFR**, The 1000 Genomes..., 2012)	661	0.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Negroids(Garte et al., 2001)	481	2.6	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
Americans of African Ancestry, USA (ASW**, The 1000 Genomes..., 2012)	61	5.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.863
Europe					
Iberians, Spain (IBS**, The 1000 Genomes..., 2012)	107	1.9	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
Tuscans, Italia (TSI**, The 1000 Genomes..., 2012)	107	3.3	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.222
English and Scotch people (GBR**, The 1000 Genomes..., 2012)	91	3.3	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.262
Europeoids in general (EUR**, The 1000 Genomes..., 2012)	503	3.5	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
Russians (Кочетова и др., 2008)	451	4.6	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.379
Finns, Finland (FIN**, The 1000 Genomes..., 2012)	99	5.1	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.853
Europeoids (Garte et al., 2001)	4790	5.2	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	0.613
South Asia					
Indians (Sam et al., 2008)	220	10.0	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
Gujarati Indians, USA (GIH**, The 1000 Genomes..., 2012)	103	10.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
South Asians in general (SAS**, The 1000 Genomes..., 2012)	489	12.7	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Bengalis, Bangladesh (BEB**, The 1000 Genomes..., 2012)	86	14.0	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.001
East Asia					
Japanese people (Nakachi et al., 1993)	170	19.4	<i>p</i> < 0.001	0.147	<i>p</i> < 0.001
Asians (Garte et al., 2001)	1132	22.8	<i>p</i> < 0.001	0.660	<i>p</i> < 0.001
East Asians in general (ASN**, The 1000 Genomes..., 2012)	504	25.2	<i>p</i> < 0.001	0.584	<i>p</i> < 0.001
Kinh, Vietnam (KHV**, The 1000 Genomes..., 2012)	99	25.8	<i>p</i> < 0.01	0.642	<i>p</i> < 0.001
Han Chinese in Beijing, China (CHB**, The 1000 Genomes..., 2012)	103	26.7	<i>p</i> < 0.01	0.467	<i>p</i> < 0.001
Southern Han Chinese (Chen et al., 2011)	350	32.9	0.060	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Inuits, Greenland (Ghisari et al., 2013)	253	46.0	0.051	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
America					
Colombians, Colombia (CLM**, The 1000 Genomes..., 2012)	94	28.2	<i>p</i> < 0.05	0.270	<i>p</i> < 0.001
Mexicans, USA (MXL**, The 1000 Genomes..., 2012)	64	33.6	0.331	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.001
Native Americans in general (AMR**, The 1000 Genomes..., 2012)	347	35.4	0.286	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001
Peruvians, Peru (PEL**, The 1000 Genomes..., 2012)	85	70.6	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001

* – data from this paper; ** – population codes are given in parentheses.

вышенному популяционному риску развития онкологических и ряда других заболеваний, в патогенезе которых принимает участие цитохром P450 1A1.

Acknowledgments

The authors are grateful to T.M. Karafet, S.G. Veprev, N.A. Moletotova, and N.A. Burlakova for participation in expeditions and technical assistance.

This work was done as part of State Contract 0324-2015-0004 and supported by the Russian Foundation for Basic Research, project GFEN 15-54-53091.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Androutsopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*. 2009;9:187-203. DOI 10.1186/1471-2407-9-187
- Baranov V.S., Baranova E.B., Ivaschenko T.E. Genom cheloveka i «geny predraspolzhenosti» (Vvedenie v prediktivnyu meditsinu) [Human Genome and «susceptibility genes» (Introduction to predictive medicine)]. St-Petersburg, Intermedika, 2000.
- Bjerregaard P., Dewailly E., Ayotte P., Pars T., Ferron L., Mulvad G. Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet. *J. Toxicol. Environ. Heal. A*. 2001; 62(2):69-81. DOI 10.1080/009841001455490
- Boyapati S.M., Shu X.O., Gao Y.T., Cai Q., Jin F., Zheng W. Polymorphisms in *CYP1A1* and breast carcinoma risk in a population-based case-control study of Chinese women. *Cancer*. 2005;103(10):2228-2235. DOI 10.1002/cncr.21056
- Butkiewicz D., Cole K.J., Phillips D.H., Harris C.C., Chorazy M. GSTM1, GSTP1, CYP1A1 and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from an environmentally polluted region of Poland: correlation with lung DNA adduct levels. *Eur. J. Cancer Prev.* 1999;8(4):315-324. DOI 10.1097/00008469-199908000-00008
- Chen S., Xue K., Xu L., Ma G., Wu J. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *GSTM1* genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in Chinese population. *Mutation Res. Mutation Res. Genomics*. 2001;458(1/2):41-47. DOI 10.1016/S1383-5726(01)00011-5
- Chen J., Cheng M., Li Y., Jiang C. Relationship between CYP1A1 genetic polymorphisms and renal cancer in China. *Asian Pacific J. Cancer Prevention*. 2011;12(9):2163-2166. DOI 10.3724/SP.J.1008.2008.00971
- Derbeneva O.A., Starikovskaya E.B., Volodko N.V., Wallace D.C., Sukernik R.I. Mitochondrial DNA variation in the Kets and Nganasans and its implications for the initial peopling of Northern Eurasia. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2002;38(11):1554-1560.
- Dolgikh B.O. Origin of Nganasan people. *Trudy Instituta Etnografii [Proceedings of Institute of Ethnography]*. Moscow; Leningrad, 1952;18:5-87.
- Dujak T.G., Gutkina N.I., Mitrofanov D.V., Afanas'eva O.A., Lyakhovich V.V., Posukh O.L., Kryukov Yu.A., Osipova L.P. Investigation of the CYP1A1 and CYP2D6 genes' polymorphism in tundra nentsis and caucasoid populations of Western Siberia. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 1998;34(11):1555-1558.
- Gallegos-Arreola M.P., Batista-González C.M., Delgado-Lamas J.L., Figuera L.E., Puebla-Pérez A.M., Arnaud-López L., Peralta-Leal V., Ramírez-Jirano L.J., Zúñiga-González G.M. Cytochrome P4501A1 polymorphism is associated with susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adult Mexican patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2004;33(3):326-329. DOI 10.1016/j.bcmd.2004.07.002
- Garte S., Gaspari L., Alexandrie A.-K., Ambrosone C., Autrup H., Autrup J.L., Baranova H., Bathum L., Benhamou S., Boffetta P., Bouchardy C., Breskvar K., Brockmoller J., Cascorbi I., Clapper M.L., Coutelle C., Daly A., Dell'Omo M., Dolzan V., Dresler C.M., Fryer A., Haugen A., Hein D.W., Hildesheim A., Hirvonen A., Hsieh L.L., Ingelman-Sundberg M., Kalina I., Kang D., Kihara M., Kiyohara C., Kremers P., Lazarus P., Le Marchand L., Lechner M.C., van Lieshout E.M., London S., Manni J.J., Maugard C.M., Morita S., Nazar-Stewart V., Noda K., Oda Y., Parl F.F., Pastorelli R., Persson I., Peters W.H., Rannug A., Rebbeck T., Risch A., Roelandt L., Romkes M., Ryberg D., Salagovic J., Schoket B., Seidegard J., Shields P.G., Sim E., Sinnet D., Strange R.C., Stücker I., Sugimura H., To-Figueras J., Vineis P., Yu M.C., Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2001;10(12):1239-1248.
- Ghisari M.E.-J. Polimorphisms in phase I and phase II genes and breast cancer risk and relations to persistent organic pollutant exposure: a case-control study in Inuit women. *Environ. Health*. 2014;13(1):19. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069x-13-19>
- Ghisari M., Long M., Bonefeld-Jorgensen E.C. Genetic polymorphisms in CYP1A1, CYP1B1 and COMT genes in Greenlandic Inuit and Europeans. *Int. J. Circumpolar Health*. 2013;72:21113. Available at: <http://www.circumpolarhealthjournal.net/index.php/ijch/article/view/21113> (Accessed 29 July 2015). DOI 10.3402/ijch.v72i0.21113
- Gichev U.P. Zagryaznenie okruzhayushchey sredy i zdorove cheloveka [Environmental pollution and human health]. Novosibirsk, SO RAMN, 2002.
- Goltsova T.V., Osipova L.P., Zhadanov S.I., Villems R. The effect of marriage migration on the genetic structure of the Taimyr Nganasan population: Genealogical analysis inferred from mtDNA markers. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2005;41(7):954-965.
- Gulyaeva L.F., Rice R.H. Biologicheskie efekty toksicheskikh soedineniy [Biological effects of toxic compounds]. Novosibirsk, NGU, 2005.
- Hahn M., Hagedorn G., Kuhlisch E., Schackert H.K., Eckelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol*. 2002;38(5):486-490. DOI 10.1016/S1368-8375(01)00086-0
- Hasler J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J.R., Farrell G., Kaminsky L.S., Spivack S.D., Boitier E., Beaune F. Human cytochromes P450. *Mol. Aspects Medicine*. 1999;20(1/2):1-137. DOI 10.1016/S0098-2997(99) 00005-9
- Hung R.J., Boffetta P., Brockmoller J., Butkiewicz D., Cascorbi I., Clapper M.L., Garte S., Haugen A., Hirvonen A., Anttila S., Kalina I., Le Marchand L., London S.J., Rannug A., Romkes M., Salagovic J., Schoket B., Gaspari L., Taioli E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*. 2003;24(5):875-882. DOI 10.1093/carcin/bgg026
- Ivaschenko T.E., Shved N.Yu., Kramareva N.L., Aylamazian E.K., Baranov V.S. Analysis of polymorphic alleles of the genes encoding the phase 1 and 2 detoxication enzymes in patients with endometriosis. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2003;39(4):525-529.
- Izmailov A.A., Pavlov V.N., Izmailova S.M., Mustafin A.T., Urmansev M.F., Alekseev A.V., Zagitov A.R., Viktorova T.V., Nogmanova V.A. Molecular genetic prognosis markers in superficial bladder cancer. *Meditsinskiy Vestnik Bashkortostana=Bashkortostan Medical Journal*. 2011;6(5):47-51.
- Joseph T., Kusumakumary P., Chacko P., Abraham A., Radhakrishna Pillai M. Genetic polymorphism of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in Indian children. *Pediatr. Blood Cancer*. 2004;43(5):560-567. DOI 10.1002/pbc.20167
- Karafet T.M., Posukh O.L., Osipova L.P. Population-genetic studies of native population of the Siberian North. *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal=Siberian Journal of Ecology*. 1994;1(2):113-127.
- Kochetova O.V., Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Iskhakova G.M., Victorova T.V. Analysis of the cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphism in the ethnic groups of the republic of Bashkortostan. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2008;44(12):1677-1683.

- Korytina G.F., Yanbaeva D.G., Viktorova T.V. Polymorphisms of the Cytochrome P450 (CYP1A1, CYP2E1) and Microsomal Epoxide Hydrolase (mEPHX) Genes in Cystic Fibrosis and Chronic Respiratory Disease. *Molekulyarnaya biologiya*=Molecular Biology (Moscow). 2003;37(5):784-792.
- Li Y., Millikan R.C., Bell D.A., Cui L., Tse C.K., Newman B., Conway K. Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms, and breast cancer risk among African American women and White women in North Carolina: a population based case-control study. *Breast. Cancer Res.* 2004;7(1):12-18. DOI 10.1186/bcr941
- London S.J., Yuan J.-M., Coetzee G.A., Gao Y.T., Ross R.K., Yu M.C. *CYP1A1 I462V* genetic polymorphism and lung cancer risk in a cohort of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 2000;9(9):987-991.
- Lyakhovich V.V., Vavilin V.A., Makarova S.I., Grishanova A.Y. Ecogenetics aspect of multifactorial diseases. *Informatsionnyy Vestnik VOGiS*=The Herald of Vavilov Soc. Genet. Breed. Sci. 2006;10(3):514-519.
- Marques C.F.S., Koifman S., Koifman R.J., Boffetta P., Brennan P., Hatagima A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol.* 2006;42(6):632-637. DOI 10.1016/j.oraloncology.2005.11.003
- Minina V.I., Druzhinin V.G., Glushkov A.N., Golovina T.A., Apal'ko S.V., Volkov A.N., Ahmatjanova V.R., Lunina A.A., Lario'nov A.V. Genotoxic effects of complex influence of radon and heavy metals depending on polymorphism of genes of enzymes monooxygenase systems. *Ekologicheskaya genetika*=Ecological genetics (St-Petersburg). 2009;7(3):53-60.
- Nakachi K., Imai K., Hayashi S., Kawajiri K. Polymorphisms of the *CYP1A1* and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.* 1993;53(13):2994-2999. DOI 10.1016/0169-5002(94)90751-X
- Nebert D.W., Dalton T.P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6(12):947-960. DOI 10.1038/nrc2015
- Osipova L.P. Genetic markers of immunoglobulin (system Gm) for the evaluation of migration and cross-breeding in human populations in Northern Siberia. *Sibirskiy Ekologicheskii Zhurnal*=Siberian Journal of Ecology. 1994;1(2):129-140.
- Osipova L.P., Posukh O.L., Ivakin E.A., Kryukov Yu.A., Karafet T.M. The gene pool of native inhabitants of the samburg tundra. *Genetika*=Genetics (Moscow). 1996;32(6):830-836.
- Osipova L.P., Sukernik R.I. Immunoglobulin allotypes in aboriginal populations of the Taimir Peninsula. *J. Immunogenet.* 1983; 10(1):11-16. DOI 10.1111/j.1744-313X.1983.tb01011.x
- Rendic S., Guengerich F.P. Summary of information on the effects of ionizing and non-ionizing radiation on cytochrome P450 and other drug metabolizing enzymes and transporters. *Curr. Drug Metab.* 2012;13(6):787-814. DOI 10.2174/138920012800840356
- Razmkhah F., Pazhakh V., Zaker F., Atashrazm F., Sheikhi M. Frequency of *CYP1A1**2C polymorphism in patients with leukemia in the Iranian population. *Lab. Medicine.* 2011;42(4):220-223. DOI 10.1309/LM337JWOSVNEHPUI
- Sam S.S., Thomas V., Reddy K.S., Surianarayanan G., Chandrasekaran A. *CYP1A1* polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *Head Neck.* 2008;30(12):1566-1574. DOI 10.1002/hed.20897
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Saprin A.N. The enzymes of metabolism and detoxification of xenobiotics. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii*=Advances in Biological Chemistry. 1991;(32):146-172.
- Sevostyanova N.V., Nekrasova A.M., Koshel A.P., Dmitrieva A.I., Martov S.I., Klokov S.S., Rakitin S.S. Polymorphism of DNA excision repair genes and genes of enzymes of biotransformation of xenobiotics in patients with gastric cancer. *Yakutskiy Meditsinskiy Zhurnal*=Yakut Medical Journal. 2009;2(26):111-113.
- Shimada T., Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 2004;95(1):1-6. DOI 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x
- Simchenko Yu.B. *Kultura okhotnikov na oleney Severnoy Evrazii* [The culture of deer hunters in North Eurasia]. Moscow, Nauka, 1976.
- Sukernik R.I., Goltsova T.V., Karaphet T.M., Osipova L.P., Galaktionov O.K. Genetic structure of isolated indigenous group in Northern Siberian – Nnganasans (Tavgiytsi) from Taymir peninsula. I. History, kinship structure, blood groups, red cell enzymes. *Genetika*=Genetics (Moscow). 1977;13(9):1653-1661.
- Sukernik R.I., Karaphet T.M., Osipova L.P. Distribution of blood groups, serum markers and red cell enzymes in two human populations from Northern Siberia. *Hum. Heredity.* 1978;28(5):321-327. DOI 10.1159/000152973
- Taspinar M., Aydos S.E., Comez O., Elhan A.H., Karabulut H.G., Sunguroglu A. *CYP1A1*, *GSTs* gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukaemia. *Swiss Medical Weekly.* 2008;138(1/2):12-17. DOI 2008/01/smw-12036
- The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491(7422):56-65. DOI 10.1038/nature11632
- Wilson E.B. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *J. Am. Statistic. Assoc.* 1927;22(158):209-212. DOI 10.2307/2276774
- Xue K., Xu L., Chen S., Ma G., Wu J. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *GSTM1* genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in Chinese population. *Mutat. Res.* 2001;458(1/2):41-47. DOI 10.1016/S1383-5726(01)00011-5
- Zhang Z., Pelletier R.D., Wong Y.N., Sugawara M., Zhao N., Littlefield B.A. Preferential inducibility of *CYP1A1* and *CYP1A2* by TCDD: Differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2006;341(2):399-407. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.12.203
- Zhuchenko N.A., Umnova N.V., Rumak V.S., Revazova Yu.A., Sidorova I.Ye., Khripach L.V., Lazarenko D.Yu., Sofronov G.A. The congenital morphogenetic variants and genetic polymorphism of the system of xenobiotic detoxication in children living in dioxin-contaminated regions of South Vietnam. *Vestnik RAMN*=Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2006;7:3-10.

Ассоциация полиморфизма G/A гена *EPAS1* со спортивной и соревновательной успешностью в группе российских борцов

Э.А. Бондарева, Е.З. Година

Научно-исследовательский институт и Музей антропологии им. Д.Н. Анучина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Многими исследователями отмечается перспективность исследования гена *EPAS1* как возможного предиктора спортивной успешности в свете его влияния на процессы доставки и потребления кислорода. Несмотря на это, в современной научной литературе данные о влиянии замен *EPAS1* на успешность в различных видах спорта крайне малочисленны и противоречивы. Целью настоящего исследования явилось изучение генетического отбора по полиморфной системе гена *EPAS1* (rs1867785) в группе спортсменов-мужчин, занимающихся самбо. В рамках исследования были обследованы 312 испытуемых этнических русских в возрасте от 18 до 30 лет. Из них 92 человека представляют контрольную группу не занимающихся спортом и 220 человек – спортсмены, профессионально занимающиеся борьбой самбо. Для каждого испытуемого, участвовавшего в исследовании, был определен генотип по однонуклеотидному полиморфизму G/A гена *EPAS1*. Анализ частот встречаемости генотипов *EPAS1* в группе спортсменов, занимающихся борьбой самбо, и контрольной группе неспортсменов выявил статистически достоверные различия. В группе спортсменов обнаружено увеличение частоты встречаемости генотипов AA и AG гена *EPAS1* ($\chi^2 = 8,68$; $p = 0,01$). Таким образом, в целом для группы спортсменов, занимающихся борьбой самбо и достигших достаточно высокого уровня спортивного мастерства, характерно наличие в генотипе минорного A-аллеля гена *EPAS1*. Отношение шансов (OR), рассчитанное для данной группы, составило OR = 1,800 (95 % CI 1,227–2,641), что свидетельствует о преимуществе спортсменов-носителей A-аллеля гена *EPAS1* перед носителями G-аллеля. Для группы единоборцев, достигших наивысшей спортивной квалификации, по сравнению с неспортсменами OR составило 1,990 (95 % CI 1,195–3,313). Полученные данные свидетельствуют о наличии направленного генетического отбора носителей A-аллеля *EPAS1* среди борцов самбо.

Ключевые слова: *EPAS1*; полиморфизм; гипоксия; спортивный отбор; генетический отбор; спортсмены высокой квалификации; борцы самбо.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Бондарева Э.А., Година Е.З. Ассоциация полиморфизма G/A гена *EPAS1* со спортивной и соревновательной успешностью в группе российских борцов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):23-27. DOI 10.18699/VJ16.121

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Bondareva E.A., Godina E.Z. Association of the *EPAS1* gene G/A polymorphism with successful performance in a group of Russian wrestlers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):23-27. DOI 10.18699/VJ16.121

ORIGINAL ARTICLE

Received 12.10.2015 г.

Accepted for publication 17.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

Association of the *EPAS1* gene G/A polymorphism with successful performance in a group of Russian wrestlers

E.A. Bondareva, E.Z. Godina

Institute and Museum of Anthropology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

A large number of studies showed that the gene *EPAS1* may serve as a possible predictor of success in sports because of its influence on the processes of oxygen transportation and consumption. However, data concerning the impact of *EPAS1* polymorphisms on sports achievements in the modern research literature are very scarce and contradictory. The aim of the present paper was to study genetic selection in the polymorphic system of the *EPAS1* gene (rs1867785) in a group of male sambo practitioners. 312 Russian males from 18 to 30 years of age were studied. Of them, 220 were professional athletes and 92 were non-athletes, who served as the control group. The genotype of a single nucleotide G/A polymorphic system of the *EPAS1* gene was determined for each participant of the study. Analysis of genotype frequencies revealed statistically significant differences between the two groups. An increase of AA and AG genotype frequencies was revealed in the group of athletes ($\chi^2 = 8.68$, $p = 0.01$). Thus, for sambo practitioners, who reached high levels, the presence of the minor A-allele in the genotypes was typical. The odd ratio (OR) calculated for this group was 1.800 (95 % CI 1.227–2.641), demonstrating that the carriers of the A-allele of the *EPAS1* gene had some advantages over the carriers of the G-allele. OR for the highest-rank wrestlers was even higher, 1.990 (95 % CI 1.195–3.313). These results suggest directed genetic selection in the A-allele carriers of the *EPAS1* gene among sambo practitioners.

Key words: *EPAS1*; polymorphism; hypoxia; sports selection; genetic selection; high-rank athletes; sambo practitioners.

Использование тренировок в гипоксических условиях – это популярный недопинговый метод повышения функциональных возможностей спортсменов (Billaut et al., 2012). Гипоксическое воздействие запускает каскад реакций на молекулярном, клеточном и в итоге на организменном уровне, которые приводят к усилению ангиогенеза и эритропоэза (Takeda et al., 2004), метаболическим изменениям и т. п. Данные процессы направлены на адаптацию к изменившимся условиям доступности кислорода. На молекулярном уровне ключевым регулятором, запускающим данные процессы, является комплекс HIF-1 (hypoxia inducible factor). Это гетеродимерный транскрипционный комплекс, в состав которого входят два белка: HIF1a и EPAS1 (HIF2a) (Majmundar et al., 2010). Несмотря на высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей HIF-1a и EPAS1 (Ema et al., 1997), последний экспрессируется главным образом в клетках эндотелия сосудов, а также в клетках эпителия в легких и в миоцитах сердца (Tian et al., 1997). В условиях нормоксии EPAS1 быстро деградирует в цитоплазме клеток, а при снижении количества кислорода стабилизируется (Giaccia et al., 2004) и транслируется в ядро клетки. Под контролем EPAS1 находится экспрессия более сотни генов, в том числе ген фактора роста эндотелия сосудов, а также его рецепторы (Takeda et al., 2004, Loboda et al., 2012).

Многие исследователи отмечают перспективность изучения гена *EPAS1* (*Endothelial PAS Domain Protein 1*) как возможного предиктора спортивной успешности (Henderson et al., 2005; Eynon et al., 2013; Voisin et al., 2014) в свете его влияния на процессы доставки и потребления кислорода. Несмотря на подобную убежденность, в современной научной литературе данные о влиянии полиморфизмов гена *EPAS1* на успешность в различных видах спорта крайне малочисленны и противоречивы. Исследование группы австралийских спортсменов показало, что *G*-аллель *EPAS1* (rs1867785) чаще встречается в группе спортсменов-стайеров по сравнению с контрольной группой (Henderson et al., 2005). На примере русских спортсменов было показано снижение частот встречаемости генотипов *GA* и *GG* в группе стайеров; частота генотипа *AA* была снижена в группе спринтеров (Voisin et al., 2014). Таким образом, остается открытым вопрос, какой из аллелей гена *EPAS1* (rs1867785) детерминирует предрасположенность к выполнению определенного рода физических нагрузок. Исследования по изучению ассоциаций данного полиморфизма со спортивной успешностью у борцов не проводились.

В представленном исследовании была предпринята попытка изучить влияние *G/A*-полиморфизма *EPAS1* на спортивную и соревновательную успешность спортсменов-мужчин, занимающихся борьбой самбо.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 312 мужчин этнических русских в возрасте от 18 до 30 лет. Из них контрольная группа состояла из 92 человек, не занимающихся спортом, и 220 человек – спортсмены, представляющие борьбу самбо. В качестве биологического материала для выделения

геномной ДНК использовали образцы буккального эпителия, собранные у спортсменов на Чемпионате России по самбо в 2008 г. (г. Москва). Представителей контрольной группы обследовали в 2009 г. на базе Российского государственного университета физической культуры, спорта, молодежи и туризма (ГЦОЛИФК). Забор биологического материала проводили при помощи стерильных урогениальных зондов (тип А «универсальный», «Jingsu Suyun Medical Materials Co LTD», Китай). После сбора биологического материала зонды высушивали и помещали в контейнер, расположенный в полый ручке зонда, для транспортирования в лабораторию. Для каждого испытуемого, участвовавшего в исследовании, был определен генотип по полиморфной системе *EPAS1* (rs1867785). Генотипирование было проведено на базе ООО «Литех», г. Москва. Все испытуемые были проинформированы о целях исследования и дали свое информированное согласие. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). Для оценки достоверности различий в распределениях генотипов использовали непараметрический критерий χ^2 .

Экспериментальная группа включала спортсменов, достигших на момент исследования различного спортивного уровня: спортсмены массовых разрядов – кандидаты в мастера спорта (КМС, 25 человек); спортсмены высокой квалификации – мастера спорта (МС, 141 человек); спортсмены международного класса – мастера спорта международного класса (МСМК, 30 человек) и заслуженные мастера спорта (ЗМС, 23 человека).

Результаты

В табл. 1 представлено численное распределение генотипов исследованной полиморфной системы у спортсменов различных квалификации, а также в контрольной группе.

Частоты встречаемости генотипов в контрольной группе: *EPAS1*AA* – 7,6 %; *EPAS1*AG* – 35,8 % и *EPAS1*GG* – 56,6 %. В экспериментальной группе спортсменов: *EPAS1*AA* – 16,0 %; *EPAS1*AG* – 44,5 % и *EPAS1*GG* – 39,5 %. Увеличение частоты встречаемости генотипов *AA* и *AG*, обнаруженное в группе спортсменов, является статистически достоверным ($\chi^2 = 8,68$; $p = 0,01$). Частоты встречаемости аллелей *EPAS1* в группе спортсменов составили: *EPAS1*A* – 38,2 %; *EPAS1*G* – 61,8 %; vs *EPAS1*A* – 25,5 %; частота встречаемости *EPAS1*G* в группе неспортсменов – 74,5 % ($\chi^2 = 8,63$, $p = 0,003$).

Из всей обследованной выборки спортсменов, принимавших участие в Чемпионате России по самбо, по результатам соревнований нами были сформированы две подгруппы: победители – спортсмены, занявшие с 1-го по 10-е места, и проигравшие – с 30-го по 45-е места. Численное распределение генотипов исследованного гена в данных группах представлено в табл. 2.

Повышение частоты *A*-аллеля в группе победителей до 40,2 %, а в группе проигравших – до 36,9 % по сравнению с неспортсменами является статистически достоверным ($\chi^2 = 7,47$; $p = 0,006$ и $\chi^2 = 3,96$; $p = 0,046$ соответственно). Частота встречаемости генотипа *AA* в группе победите-

Table 1. Frequency distribution of *EPAS1* genotypes in the subsamples of the studied sample established according to athletes' ranking

Subsamples of the studied sample	Genotypes for the <i>EPAS1</i> gene			Total
	<i>EPAS1</i> *AA	<i>EPAS1</i> *AG	<i>EPAS1</i> *GG	
Athletes	35	98	87	220
CMS	3	12	10	25
MS	23	60	58	141
IMS + MMS	9	25	19	53
Non-athletes	7	33	52	92

CMS, Candidates for Master of Sport; MS, Masters of Sport; IMS, International Class Masters of Sport; MMS, Merited Masters of Sport

Table 2. Frequency distribution of *EPAS1* genotypes in subsamples of the studied sample established according to athletes' competitive success

Subsamples of the studied sample	Genotypes for the <i>EPAS1</i> gene			Total
	<i>EPAS1</i> *AA	<i>EPAS1</i> *AG	<i>EPAS1</i> *GG	
Winners	11	23	22	56
Losers	8	29	24	61
Non-athletes	7	33	52	92

лей составила 19,6 %, а в группе проигравших – 13,1 %. В контрольной группе этот генотип встречается с частотой 7,6 %.

Обсуждение

Устойчивость к гипоксии является одним из важных качеств, определяющих успех в современных спортивных единоборствах. Однако индивидуальные генетические особенности, обуславливающие адаптацию к гипоксическим воздействиям, могут в значительной мере способствовать достижению лучших спортивных результатов (Henderson et al., 2005; Voisin et al., 2014). Одним из перспективных молекулярно-генетических маркеров, участвующих в процессе адаптации организма к гипоксическим условиям, является G/A-полиморфизм гена *EPAS1*.

В целом для выборки мужчин, занимающихся борьбой самбо и достигших достаточно высокого уровня спортивного мастерства, характерно наличие в генотипе минорного A-аллеля гена *EPAS1*. Отношение шансов составило OR = 1,800 (95 % CI 1,227–2,641), что свидетельствует о преимуществе спортсменов-носителей A-аллеля гена *EPAS1* перед носителями G-аллеля. Полученные данные свидетельствуют о направленном генетическом отборе по полиморфной системе гена *EPAS1* в борьбе самбо. Далее нами была предпринята попытка проследить обнаруженный тренд внутри спортивной выборки по двум направлениям: по уровням спортивной (от КМС до ЗМС) и соревновательной успешности (от победителей к проигравшим).

Частота встречаемости генотипа AA возрастает с 12,0 % у кандидатов в мастера спорта до 17 % у мастеров спорта

международного класса и заслуженных мастеров спорта с соответствующим уменьшением частоты встречаемости генотипа GG с 56,5 % до 35,8 % соответственно. Отношение шансов (OR), рассчитанное для группы единоборцев, достигших международного уровня (МСМК и ЗМС), по сравнению с неспортсменами составило 1,990 (95 % CI 1,195–3,313). Таким образом, обнаруженный для всей обследованной выборки спортсменов, отбор носителей A-аллеля продолжается и усиливается внутри нее.

Одним из основных вопросов спортивной генетики является возможность прогнозирования соревновательной успешности для носителей альтернативных аллелей и/или генотипов. Отношение шансов, рассчитанное для группы победителей по сравнению с контрольной группой, составило 2,082 (95 % CI 1,255–3,454). Данное значение даже выше, чем в группе спортсменов международного уровня. Таким образом, наличие в генотипе испытуемых A-аллеля гена *EPAS1* по сравнению с носителями G-аллеля не только способствует достижению спортсменами высокого уровня спортивного мастерства, но и более чем в два раза повышает их шансы занять призовые места.

Выбранный нами полиморфизм *EPAS1* был ранее изучен на выборках спортсменов. Однако полученные авторами результаты противоречат друг другу. Так, на примере русских спортсменов показано снижение частоты генотипа AA в группе спортсменов, выступающих в видах спорта, требующих преимущественного развития скоростно-силовых качеств (Voisin et al., 2014). В то же время увеличение частоты встречаемости G-аллеля было отмечено в группе австралийских спортсменов-стайеров (Henderson et al., 2005). Вероятно, подобные результаты обусловлены

этногенетическими различиями участников проведенных исследований. С другой стороны, в представленных исследованиях анализировались группы, сформированные из представителей различных видов спорта, по численности не превышающие двух десятков человек для каждого конкретного вида спорта и спортивной специализации. Возможно, объединение таких видов спорта, как спринтерский бег, пауэрлифтинг и различные виды спортивных единоборств, в одну экспериментальную группу является некорректным для исследований молекулярно-генетических маркеров устойчивости к гипоксии.

В исследованную нами выборку вошли спортсмены мужского пола – представители одного вида спорта, борьбы самбо, являющиеся этническими русскими и выступавшие в близких весовых категориях полусреднего и среднего весов (68–90 кг). Также нами были изучены ассоциации данного молекулярно-генетического маркера со спортивной и соревновательной успешностью обследованного контингента. Продемонстрированное увеличение частоты встречаемости *AA*-генотипа *EPAS1* в группе спортсменов международного класса (МСМК и ЗМС) и в группе победителей соревнований дает веские основания полагать, что G/A-полиморфизм гена *EPAS1* может быть использован как предиктор предрасположенности к спортивным единоборствам, в частности к борьбе самбо у этнических русских мужчин.

Ген *EPAS1* был идентифицирован в ходе исследования по поиску участков генома, ассоциированных с уровнем потребления кислорода у спортсменов (Bouchard et al., 2000). Белковый продукт гена *EPAS1* осуществляет комплексный контроль над процессами адаптации к гипоксическим условиям (ангиогенез и ремоделинг сети капилляров, эритропоэз, концентрация гемоглобина, уровень гематокрита) (Beall et al., 2010); участвует в регуляции уровня катехоламинов (Tian et al., 1998) и развитии сердца. Мыши, нокаутные по гену *EPAS1*, отличаются множественными патологиями внутренних органов и ослабленным ответом на окислительный стресс (Scortegagna et al., 2003). Поэтому замены, каким-либо образом влияющие на экспрессию данного гена, оказывают множественное воздействие на все процессы, подконтрольные белковому продукту гена *EPAS1*. Возможно, преимущественный отбор носителей *A*-аллеля *EPAS1* обусловлен не только более эффективными процессами ангиогенеза и эритропоэза, но и определенными метаболическими сдвигами в скелетных мышцах (Wada, 2007; Kelly et al., 2010; Ge et al., 2012). Так, одной из метаболических адаптаций к гипоксии является усиление гликолиза на фоне снижения окислительных процессов в митохондриях (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). *EPAS1* влияет на то, насколько эффективно осуществляется переключение организма от использования главным образом аэробного пути потребления энергии, требующегося для продолжительных упражнений, к преимущественному использованию гликолиза, эффективно для коротких интенсивных выбросов энергии (Formenti et al., 2010; Majmundar et al., 2010). Исследованный нами G/A-полиморфизм находится в интронной части *EPAS1* и не влияет на аминокислотную последовательность белкового продукта. В связи с этим сложно судить о конкретном молекулярном механизме влияния данного

генетического маркера на физиологические особенности спортсменов. Вероятно, носители минорного *A*-аллеля более эффективно используют возможности сердечно-сосудистой системы для адаптации к гипоксическим условиям, возникающим во время выполнения физических упражнений, и быстрее реагируют на гипоксию в целом, что дает им преимущество в различных видах спорта, в частности в борьбе самбо.

Продемонстрирован генетический отбор в группе высококвалифицированных спортсменов, занимающихся борьбой самбо. Частота минорного *A*-аллеля полиморфной системы гена *EPAS1* выше в группе борцов самбо по сравнению с контрольной группой неспортсменов. Более того, повышение частоты встречаемости *A*-аллеля и генотипа *AA* происходит при возрастании уровня спортивного мастерства от КМС к ЗМС, а также она выше в группе спортсменов, занявших призовые места, по сравнению со спортсменами, проигравшими соревнования. Полученные данные убедительно свидетельствуют о преимуществе спортсменов-носителей *A*-аллеля гена *EPAS1* перед носителями исходного *G*-аллеля. G/A-полиморфизм гена *EPAS1* может быть использован при отборе, профилизации и прогнозировании спортивной и соревновательной успешности в борьбе самбо.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-06-00702a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Beall C.M., Cavalleri G.L., Deng L., Elston R.C., Gao Y., Knight J., Li C., Li J.C., Liang Y., McCormack M., Montgomery H.E., Pan H., Robbins P.A., Shianna K.V., Tam S.C., Tsering N., Veeramah K.R., Wang W., Wangdui P., Weale M.E., Xu Y., Xu Z., Yang L., Zaman M.J., Zeng C., Zhang L., Zhang X., Zhaxi P., Zheng Y.T. Natural selection on *EPAS1* (*HIF2alpha*) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010;107(25):11459–11464. DOI 10.1073/pnas.1002443107
- Billaut F., Gore C.J., Aughey R.J. Enhancing team-sport athlete performance: is altitude training relevant? *Sports Med*. 2012;42:751–67. DOI 10.2165/11634050-000000000-00000
- Bouchard C., Rankinen T., Chagnon Y.C., Rice T., Perusse L., Gagnon J., Borecki I., An P., Leon A.S., Skinner J.S., Wilmore J.H., Province M., Rao D.C. Genomic scan for maximal oxygen uptake and its response to training in the HERITAGE Family Study. *J. Appl. Physiol*. 2000;88:551–559.
- Ema M., Taya S., Yokotani N., Sogawa K., Matsuda Y., Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997;94:4273–4278.
- Eynon N., Hanson E.D., Lucia A., Houweling P.J., Garton F., North K.N., Bishop D.J. Genes for elite power and sprint performance: *ACTN3* leads the way. *Sports Med*. 2013;43:803–817. DOI 10.1007/s40279-013-0059-4
- Formenti F., Constantin-Teodosiu D., Emmanuel Y., Cheeseman J., Dorrington K.L., Edwards L.M., Humphreys S.M., Lappin T.R., McMullin M.F., McNamara C.J., Mills W., Murphy J.A., O'Connor D.F., Percy M.J., Ratcliffe P.J., Smith T.G., Treacy M., Frayn K.N., Greenhaff P.L., Karpe F., Clarke K., Robbins P.A. Regulation of hu-

- man metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010;107(28):12722-12727. DOI 10.1073/pnas.1002339107
- Ge R.L., Simonson T.S., Cooksey R.C., Tanna U., Qin G., Huff C.D., Witherspoon D.J., Xing J., Zhengzhong B., Prchal J.T., Jorde L.B., McClain D.A. Metabolic insight into mechanisms of high-altitude adaptation in Tibetans. *Mol. Genet. Metab.* 2012;106(2):244-247. DOI 10.1016/j.ymgme.2012.03.003
- Giaccia A.J., Simon M.C., Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 2004;18:2183-2194.
- Henderson J., Withford-Cave J.M., Duffy D.L., Cole S.J., Sawyer N.A., Gulbin J.P., Hahn A., Trent R.J., Yu B. The *EPAS1* gene influences the aerobic-anaerobic contribution in elite endurance athletes. *Hum. Genet.* 2005;118:416-423.
- Kelly K.R., Williamson D.L., Fealy C.E., Kriz D.A., Krishnan R.K., Huang H., Ahn J., Loomis J.L., Kirwan J.P. Acute altitude-induced hypoxia suppresses plasma glucose and leptin in healthy humans. *Metabolism.* 2010;59(2):200-205. DOI 10.1016/j.metabol.2009.07.014
- Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177-185.
- Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. HIF-1 versus HIF-2—is one more important than the other? *Vascul. Pharmacol.* 2012;56:245-251. DOI 10.1016/j.vph.2012.02.006
- Majmundar A.J., Wong W.J., Simon M.C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell.* 2010;40:294-309. DOI 10.1016/j.molcel.2010.09.022
- Papandreou I., Cairns R.A., Fontana L., Lim A.L., Denko N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3(3):187-197.
- Scortegagna M., Morris M.A., Oktay Y., Bennett M., Garcia J.A. The HIF family member *EPAS1/HIF-2alpha* is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood.* 2003;102:1634-1640.
- Takeda N., Maemura K., Imai Y., Harada T., Kawanami D., Nojiri T., Manabe I., Nagai R. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circulation Res.* 2004;95:146-153.
- Tian H., Hammer R.E., Matsumoto A.M., Russell D.W., McKnight S.L. The hypoxia-responsive transcription factor *EPAS1* is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 1998;12:3320-3324.
- Tian H., McKnight S.L., Russell D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (*EPAS1*), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11:72-82.
- Voisin S., Cieszczyk P., Pushkarev V.P., Dyatlov D.A., Vashlyayev B.F., Shumaylov V.A., Maciejewska-Karlowska A., Sawczuk M., Skuza L., Jastrzebski Z., Bishop D.J., Eynon N. *EPAS1* gene variants are associated with sprint/power athletic performance in two cohorts of European athletes. *BMC Genomics.* 2014;18(15):382. DOI 10.1186/1471-2164-15-382
- Wada T. Transcription factor *EPAS1* regulates insulin signaling pathway. *Yakugaku Zasshi.* 2007;127(1):143-151.

Признаки дестабилизации при отборе на кататонию, проявляющиеся в изменении поведенческих и соматовегетативных параметров у крыс

Т.А. Алехина¹, Н.А. Пальчикова², Р.В. Кожемякина¹, О.И. Прокудина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск, Россия

В настоящей работе на организменном уровне рассмотрены признаки дестабилизации при селекции крыс на кататонический тип реагирования. Использована уникальная линия крыс ГК (генетическая кататония), в которую отбирали животных с длительным периодом пассивно-оборонительной реакции застывания. Целью данной работы было выявление признаков дестабилизации при отборе в линию крыс ГК по поведенческим и соматовегетативным параметрам. На поведенческом уровне дестабилизация проявилась в агрессивных реакциях по отношению к человеку (тест «на перчатку»). Был выявлен факт изменения уровня кортикостерона у крыс ГК: в состоянии покоя содержание этого гормона в фекалиях было снижено, а при взятии животных в руки оказалось повышенным. В метаболической системе обнаружено снижение энергетических запасов на углеводном (по содержанию глюкозы в крови), а также липидном (по содержанию триглицеридов) уровнях. Однако по концентрации в крови инсулина, влияющего на транспорт глюкозы через мембрану клетки, межлинейных различий не было обнаружено. Также мы не получили различий между крысами Вистар и ГК по уровню другого вида липидов – холестерина, который играет важную роль как в энергетическом, так и пластическом обмене. Сопутствующим эффектом при селекции на кататонию явилось ухудшенное состояние шерстного покрова у крыс линии ГК. По общему показателю физического развития – массе тела – крысы кататонической линии отстают от крыс из исходной популяции Вистар как в неонатальном периоде, так и во взрослом состоянии. Все эти изменения указывают на модификацию поведенческих и соматовегетативных паттернов и свидетельствуют об усилении пассивно-оборонительной компоненты при селекции крыс линии ГК.

Ключевые слова: селекционная модель; кататония; гормоны; волосы; масса тела; тест «на перчатку»; иммуноферментный анализ; световая микроскопия.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Алехина Т.А., Пальчикова Н.А., Кожемякина Р.В., Прокудина О.И. Признаки дестабилизации при отборе на кататонию, проявляющиеся в изменении поведенческих и соматовегетативных параметров у крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Alekhina T.A., Palchikova N.A., Kozhemyakina R.V., Prokudina O.I. Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):28-33. DOI 10.18699/VJ16.103

ORIGINAL ARTICLE

Received 14.10.2015 г.

Accepted for publication 17.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

✉ e-mail: alek@bionet.nsc.ru

Destabilization signs in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia

T.A. Alekhina¹, N.A. Palchikova²,
R.V. Kozhemyakina¹, O.I. Prokudina¹

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

² Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Experimental and Clinical Medicine», Novosibirsk, Russia

The article presents data on destabilization signs in response to selection for catatonia at an organismal level. Experiments were conducted with the unique GC (genetic catatonia) rat strain selected for long passive-defensive freezing. The goal of this study was to detect destabilization signs in the behavioral and somatovegetative parameters of GC rats emerging in response to selection. The destabilization manifested itself as changes in rat attitudes towards humans, as became apparent from the glove test. Altered hormone levels in GC rats were detected: corticosterone concentrations were reduced in feces and increased during handling. The metabolic system showed a decrease in energy stored accompanying the fast (glucose level) and slow (triglyceride level) responses. However, the strains did not differ in the concentration of insulin, which affects glucose transport through the cell membrane. Nor did we find differences between Wistar and GC rats in cholesterol level. This lipid is important for both energy and constructive metabolism. A side effect of selection for catatonia was the worse pelage status in GC rats. The overall physical condition of catatonic rats involved reduced body weight in both neonates and adults. All these changes point to the modification of behavioral and somatovegetative patterns and intensification of the passive-defensive component of selection in GC rats.

Key words: selection model; catatonia; hormones; hair; body weight; Glove test; immune-enzyme analysis; light microscopy.

К признакам дестабилизации в организме относят нарушение стабильности каких-либо процессов, свойств и состояний. Длительная селекция по domestикации привела к устойчивым и порой непредсказуемым процессам, которые проявились в фенотипических изменениях. Так, при отборе лисиц на «ручное» поведение появились животные с депигментированным шерстным покровом, неправильным прикусом, вывернутыми передними и укороченными задними лапами (Беляев, 1966; Belyaev, 1979; Трут, 2000). У норок в результате селекции на domestикацию были описаны многочисленные депигментированные пятна на мехе, формы с искривленными и укороченными хвостами и появление миниатюрных животных (Траpezov, 1997a, b). У белых крыс, отбираемых на застывание в домашней клетке, появились прыгающие и мечущиеся по клетке животные (Рязанова и др., 2012). Все эти показатели указывают на дестабилизирующие черты селекции, свидетельствующие о модификации консервативных признаков, характерных для стабилизирующего отбора (Шмальгаузен, 1968).

В.Г. Колпаков, работавший с белыми крысами, теоретически обосновал модель негативного полюса шизофрении на животных (Kolpakov et al., 1983, 1986, 1996; Колпаков и др., 1985; Колпаков, 1990) и высказал предположение о возможности довести долю застывающих каталептоподобных особей до 100 %. Селекция началась с отбора крыс, значительно отличающихся по времени неподвижности от крыс из исходной популяции Вистар (Барыкина и др., 1983). Однако к 40-му поколению селекции доля «нервных» (прыгающих и мечущихся по клетке) животных резко увеличилась (Рязанова и др., 2012). Это выразилось в снижении количества застывающих крыс в линии. В последующем в течение 30 поколений число «нервных» крыс только росло. В результате повторной селекции была подтверждена гипотеза, по которой каталептическое застывание и «нервность» имеют одни и те же генетические корни (Чугуй и др., 2007). Мы вынуждены были заключить, что линия ГК (генетическая кататония) оказалась двухполюсной моделью поведения, в которой проявляются и застывание, и возбуждение (Барыкина и др., 2004; Алехина и др., 2005). Кроме того, в этой линии было показано снижение престаимпульного и латентного торможения (Bagykina et al., 2004; Алехина и др., 2008), что вместе с проявлением двухполюсности поведения соответствует кататоническому фенотипу.

После 60 поколений отбора отмечено изменение фенотипа у крыс линии ГК. Изменился шерстный покров, стали появляться лысины на дорсальной части тела, частота волос на квадратный сантиметр снизилась, уровень «нервности» возрос и крысы стали мельче.

Целью настоящей работы было выявление признаков дестабилизации при отборе в линию крыс ГК в 70-х поколениях селекции по поведенческим и соматовегетативным параметрам. Поставлены следующие задачи по конкретизации механизмов проявления наблюдаемых признаков: провести морфометрический анализ волосяного покрова; измерить реакции крыс на хэндлинг, уровни гормонов и метаболитов в крови, связанных со стрессорными реакциями и с липидным обменом, динамику прироста массы

тела у крыс линии ГК в разном возрасте по сравнению с исходной популяцией Вистар.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В работе использовали самцов крыс линий Вистар ($n = 81$) и ГК ($n = 128$) в возрасте 3–4 мес. Животных содержали в виварии ИЦиГ СО РАН по 5–6 крыс в клетке при свободном доступе к воде и корму. Условия содержания и протоколы работы с животными утверждены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН, все процедуры на крысах проведены в соответствии с рекомендациями международного Совета Европейского Сообщества (директива от 24 ноября 1986, 86/609/ЕЕС).

Из животных были сформировали три группы. Всех животных, взятых в эксперимент, рассадил в клетки по одному.

Тест «на перчатку»

У животных из первой группы через пять дней после начала эксперимента проверяли реакцию на руку человека в перчатке (Plyusnina et al., 2009). За проявление негативной или позитивной реакции по отношению к человеку присваивали баллы от –4 до +4. Агрессивность (негативная реакция) в баллах оценивали следующим образом:

- 1: крыса сидит около задней стенки, отворачивает голову от протянутой к ней перчатке, уделяет ей мало внимания, часто занимает позицию «носом в угол», сопротивляется взятию в руки, испускает угрожающие звуки;
- 2: крыса сидит около задней стенки, сильно напряжена, предпринимает попытки укусить перчатку;
- 3: бросается на перчатку, издает угрожающие звуки, при распахнутой двери выпрыгивает из клетки;
- 4: крыса ждет перчатку около двери клетки, издает угрожающие звуки, бросается целенаправленно на руку.

Эмоциональные положительные реакции по баллам распределяли так:

- +1: крыса сидит около задней стенки, тянется к руке, но боится касаться перчатки;
- +2: крыса тянется к руке и исследует ее, оставаясь около задней стенки клетки, она все еще избегает контактов с перчаткой;
- +3: подходит к перчатке, исследует ее, не избегает хэндлинга и не издает протестующей вокализации;
- +4: активно исследует перчатку, не показывает никаких негативных эмоций при взятии в руки, спокойно относится к хэндлингу.

Определение гормонов

Две другие группы крыс были сформированы для определения уровней кортикостерона в фекалиях и плазме крови. У крыс из второй группы через пять дней клетки чистили, засыпали новыми опилками и на шестой день собирали фекалии. После высушивания и гомогенизации фекалий экстрагировали стероидные гормоны для дальнейшего определения в экстракте уровня кортикостерона.

Через пять дней крыс из третьей группы декапитуировали в операционной комнате и брали кровь для анализа.

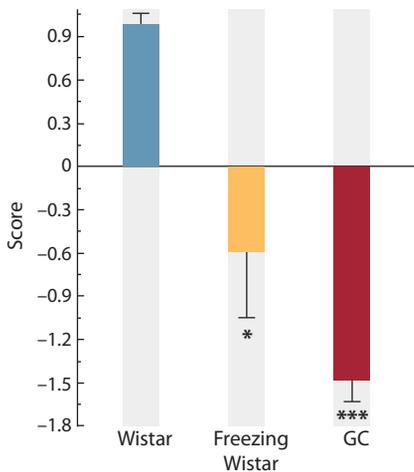


Fig. 1. Glove test for Wistar and GC rats.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, significance of differences from Wistar rats.

Корм и воду из клеток в течение эксперимента не убирали.

Содержание кортикостерона в фекалиях и в плазме крови определяли радиоиммунным методом с использованием $[1,2,6,7-^3\text{H}]$ Corticosterone (Amersham, Англия) и Corticosterone antiserum (Sigma-Aldrich, США). Счет радиоактивности проб проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-6500, используя оборудование ЦКП «Современные оптические системы» НИИЭКМ.

Содержание глюкозы, триглицеридов и холестерина в плазме крови измеряли с использованием наборов «FLUTEST GLU», «FLUTEST CHOL», «Biosub TG» (Biocon, Германия) на спектрофотометре СФ-2000.

Морфометрия волосяного покрова

Проанализированы волосы с одного и того же участка дорсальной поверхности тела у взрослых крыс ГК и Вистар. Образцы волос взяты с двух мест: «лысины» и соседнего с ней участка кожи. Контролем служили волосы, взятые у крыс Вистар с аналогичных участков. На гистологических препаратах провели морфометрический анализ остевых и пуховых волос.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с помощью одно- и двухфакторного анализа с исполь-

зованием пакета компьютерных программ Statistica (версия 10.0), с post hoc сравнением выборочных средних по критерию LSD. При обработке поведенческих данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Значения в таблицах представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка.

Результаты

По поведенческому тесту «на перчатку» были получены следующие результаты (рис. 1). Наибольшее число баллов по толерантному поведению по отношению к человеку набрали крысы Вистар. Крысы ГК вели себя агрессивно и достоверно отличались от крыс Вистар. Контрольные крысы Вистар, отобранные на застывание в домашней клетке, заняли промежуточное положение.

В табл. 1 показаны результаты определения стрессорных и гомеостатических параметров у крыс двух линий. Обнаружено, что содержание кортикостерона в фекалиях у крыс линии ГК значительно меньше, чем у крыс Вистар. В то же время концентрация этого гормона в плазме крови кататонических животных выше по сравнению с контрольной группой Вистар. Судя по изменению уровня основного гормона стресса, кортикостерона, эти данные указывают на повышенную реактивность крыс ГК при взятии их в руки.

При оценке энергетического баланса учитывают концентрацию углеводов и липидов в плазме крови. По этим параметрам были показаны уменьшение содержания глюкозы и снижение уровня триглицеридов у крыс линии ГК по сравнению с крысами Вистар (табл. 1). По содержанию инсулина и холестерина в плазме крови у крыс Вистар и ГК различий не обнаружено. По концентрации белка эти линии также не различались.

Возможной причиной появления «лысин» и прореженного роста волос у крыс линии ГК мог быть измененный гормональный баланс. Остевые волосы крыс Вистар у корня узкие, расширяются к середине, их сердцевина имеет сложное строение и состоит из 7–9 слоев клеток. К вершине остевые и пуховые волосы сужаются. Пуховые волосы – тонкие на всем протяжении от корня до вершин и содержат одну слой клеток. Корни зрелых и пуховых волос крыс Вистар имеют обычную булавообразную форму. Исследование показало, что «лысые» участки кожи крыс ГК не являются таковыми, так как на них присутствуют тонкие, короткие пуховые волосы и практически отсутствуют остевые. Морфометрический анализ волос у кататонических крыс с участка, расположенного рядом с «лысиной», показал, что остевые и пуховые волосы на этом месте по сравнению с волосами крыс Вистар большего диаметра и длиннее (табл. 2). Отмечаются нарушения по длине и в корнях волос, выраженные чрезмерным сужением или расширением. Изменилась форма корней остевых волос. Стержни волос у корня часто сильно расширены, а сами корни вытянуты, изогнуты в виде клюшки и расщеплены.

Маркером снижения липидного обмена стало уменьшение на 45 % уровня триглицеридов у крыс линии ГК (табл. 1). Возможно, что одной из причин падения веса явился дефицит самого распространенного типа жиров – триглицеридов в плазме крови у кататонических животных.

Крысы были взвешены в 1-й и 20-й дни, а также в 1, 3 и 6 мес. (рис. 2). Прогрессирующее отставание в весе у крыс ГК по сравнению с крысами Вистар указывает на наследственную основу этого признака.

Обсуждение

Из общих свойств нервной системы, моделируемых на животных (реактивность, активность и эмоциональность), у крыс ГК была подтверждена повышенная реактивность. Это было сделано при помощи поведенческого теста «на перчатку» и при определении уровня гормона адаптации и стресса, кортикостерона, в фекалиях и крови. У крыс-кататоников при тестировании «на перчатку» были обнаружены черты агрессии по отношению к человеку. Реакция крыс ГК – пассивно-оборонительная. Они становятся на задние лапы и прижимаются к задней стенке клетки, при этом не проявляют исследовательской активности, игнорируют и не обнюхивают перчатку. Однако если взять крысу в руки, то она изворачивается и, сильно оттолкнувшись, может

Table 1. Stress and metabolic parameters in Wistar and GC rats

Parameters	Wistar	GC
Corticosterone in feces ($\mu\text{g/day}$)	1.86 ± 0.28 (16)	$1.15 \pm 0.12^*$ (17)
Contents in blood plasma:		
corticosterone (ng/ml)	35.3 ± 9.3 (8)	$85.2 \pm 15.1^*$ (10)
insulin (pmol/l)	102.1 ± 17.0 (5)	112.2 ± 8.9 (10)
glucose (mmol/l)	5.63 ± 0.3 (18)	$5.18 \pm 0.01^*$ (20)
cholesterol (mmol/l)	1.76 ± 0.14 (8)	1.52 ± 0.07 (10)
triglyceride (mmol/l)	1.50 ± 0.15 (8)	$0.83 \pm 0.09^{**}$ (10)
protein (g/l)	67.7 ± 1.8 (8)	71.0 ± 1.24 (10)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, significance of differences from Wistar rats. Parenthesized are numbers of animals.

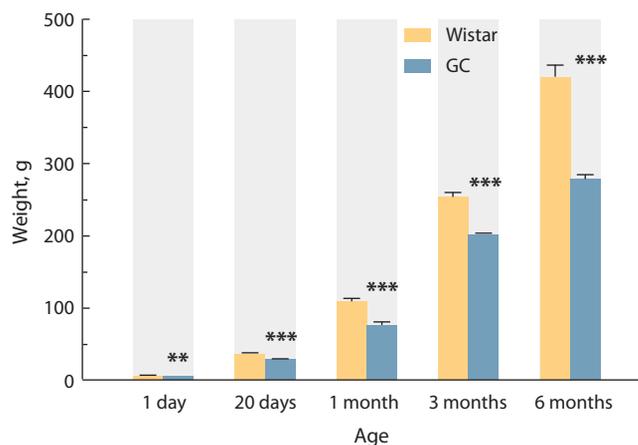
Table 2. Hair morphometric parameters in Wistar and GC rats

Rat strain	Length, mm		Hair diameter, μm			
			root		middle	
	awn	flu	awn	flu	awn	flu
Wistar (norm) ($n = 47$)	12.5 ± 0.3	9.5 ± 0.3	29.7 ± 1.0	14.5 ± 1.3	129.5 ± 4.1	27.5 ± 1.2
GC						
norm ($n = 50$)	$14.5 \pm 0.3^{***}$	$11.5 \pm 0.08^{***}$	$82.0 \pm 5.6^{***}$	$18.8 \pm 1.4^*$	$153.7 \pm 5.5^{***}$	27.0 ± 1.3
bald spot ($n = 41$)	–	8.5 ± 0.2	–	11.2 ± 0.9	–	21.8 ± 3.2

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, significance of differences between Wistar and GC; n , number of animals.

выпрыгнуть, при этом издает короткие писк. В среднем крысы ГК по шкале агрессивности достоверно отличаются от крыс Вистар. Их поведение по отношению к человеку похоже на поведение «диких» крыс, отловленных в хранилищах магазинов и содержащихся в виварии ИЦиГ СО РАН. «Дикие» крысы значительно чаще спасаются бегством или прыжком при попытке взять их в руки. В англоязычной литературе их называют «jumping», т. е. «прыгающие». Обе группы крыс, и «дикие», и ГК – «прыгающие», набрали по шкале агрессивности близкое число баллов (у ГК –1,8; у «диких» –2,4) (Прасолова и др., 2014). По полученным в настоящей работе данным, группа «застывающие Вистар» (рис. 1) занимает промежуточное положение и находится между «ручными» крысами Вистар и крысами ГК. Эта промежуточная группа соответствует первому поколению селекции ГК и набирает около –0,5 балла по шкале агрессивности. В 20-х поколениях селекции крыс-каталептиков можно было спокойно брать в руки и придавать им неудобную позу на крестце, т. е. они были «ручными». Но начиная с 40-го поколения половина крыс ГК превратилась в «нервных» и стала проявлять акты агрессии по отношению к человеку (Рязанова и др., 2012). Таким образом, селекция на кататонический тип реагирования привела к неожиданному результату: лабораторные крысы ГК стали проявлять признаки агрессии и «дикости».

В настоящем исследовании представлены факты, указывающие на разное содержание кортикостерона у крыс ГК в разных ситуациях. Было показано, что, когда крысы оставались в течение суток в одиночной клетке

**Fig. 2.** Body weights of Wistar and GC rats at different points of development.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, significance of differences from Wistar rats.

и в комнату, где их содержали, никто не заходил, т. е. они находились в состоянии покоя, суточная экскреция кортикостерона с фекалиями у крыс-кататоников была ниже, чем у крыс Вистар. Однако в другом эксперименте при взятии крыс ГК в руки уровень кортикостерона в плазме крови у них резко поднимался и превышал исходный уровень более чем в два раза. Если на ранних этапах селекции содержание кортикостерона в плазме крови у крыс ГК было сниженным по сравнению с крысами Вистар (Амстиславский и др., 2000), то на последних

этапах селекции, как показали представленные данные, оно оказалось повышенным. Эти факты мы связываем с изменением поведения в разных поколениях селекции: на ранних этапах у крыс ГК доминировало торможение, а на более поздних – возбуждение.

Полученные данные указывают на свойство повышенной общей реактивности у крыс ГК, не характерное лабораторным животным Вистар. Несмотря на то что селекция по-прежнему ведется по критерию длительного застывания, признаки, свойственные «диким» животным, все чаще появляются у крыс линии ГК. Проявление этих непредвиденных характеристик говорит о расширении изменчивости в поведенческой и гормональной системах и свидетельствует о признаках дестабилизации в кататонической популяции.

Селекция по поведению в первую очередь основывается на реакциях нейроэндокринной системы, которая тесно взаимодействует с энергетическим обеспечением организма. В настоящей работе показано, что такие показатели, как уровень глюкозы и триглицеридов в крови, снижены у крыс линии ГК. В то же время по уровню инсулина, контролирующего содержание глюкозы, и по уровню холестерина, одного из видов липидов, мы не обнаружили межлинейных различий. Факты снижения концентрации глюкозы и триглицеридов указывают на более низкие возможности энергетических трат при стрессе как из источника быстрых углеводов, так и из резервного депо липидов. На поведенческом уровне сниженные возможности затрат энергии выражаются в более экономном длительном застывании и понижении общей двигательной активности, что и проявилось в различных поведенческих тестах (Барыкина и др., 1983; Алехина и др., 2005; Барыкина и др., 2009). У «нервных» крыс ГК, которые по численности в последних поколениях селекции стали преобладать над «застывающими» (Рязанова и др., 2012), показано еще большее сокращение количества двигательных реакций и повышение числа реакций застывания в тестах открытого поля и в светло-темной камере (Алехина и др., 2005).

Визуально крысы ГК не выглядят миниатюрными, а имеют вид худых животных. Понижение веса тела у самцов крыс линии ГК может быть связано со значительным снижением уровня триглицеридов как наиболее распространенной формы жира в мышцах. Дефицит массы тела у самок кататонической линии в разном возрасте был описан в наших более ранних работах (Клочков и др., 2011).

Измененные в ходе селекции нейрогормональные составляющие (Шульга и др., 1996; Алехина и др., 2006; Рязанова и др., 2012) могут привести к сопутствующему эффекту, влияющему на формирование волосяных фолликулов, и отразиться на морфометрических характеристиках шерстного покрова (Fischer et al., 2008; Оськина и др., 2010; Прасолова и др., 2013). Стержни волос у крыс-кататоников более грубые и длинные по сравнению с таковыми у крыс Вистар. Отмечаются нарушения и в морфологии волос: часто встречаются чрезмерные сужения и расширения между слоями клеток. Все это указывает на дестабилизирующие черты при формировании шерстного покрова у животных кататонической линии.

Итак, вектор отбора на кататоническое реагирование привел к появлению следующих признаков дестабилизации у крыс линии ГК. На поведенческом уровне дестабилизация проявилась в повышенной агрессивности по отношению к человеку. Это основывалось на изменении уровня основного гормона стресса – кортикостерона: при взятии крыс ГК в руки содержание котикостерона у них резко повышалось. В метаболических системах было обнаружено снижение потенциальных энергетических запасов у интактных животных, что выразилось в уменьшении содержания глюкозы и триглицеридов в крови. Сопровождающим эффектом селекции на кататонию явилось ухудшенное состояние шерсти у крыс линии ГК. По общему параметру физического развития – массе тела – крысы кататонической линии отстают от животных исходной популяции Вистар. Все эти факты указывают на то, что в 70-х поколениях селекции произошли изменения в поведенческих и соматовегетативных паттернах. Они также свидетельствуют об усилении пассивно-оборонительной компоненты при отборе крыс в линию ГК.

Acknowledgments

The authors are grateful to L.A. Prasolova for morphometric analysis of hair in animals and fruitful discussion of the results and to employees of the conventional animal vivarium, ICG, Novosibirsk, for handling and timely provision with ordered rat strains.

This work was done as part of State Contract 0324-2015-0004 and supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-00422.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alekhina T.A., Barykina N.N., Petrenko O.I., Chugui V.F., Kolpakov V.G. Pathomorphosis of cataleptic reactions in rats. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii* = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2005;41(6):534-538.
- Alekhina T.A., Petrova G.V., Barykina N.N., Prokudina O.I., Chugui V.F., Sakharov D.G., Kolpakov V.G. Some neuroendocrinological changes in rats of cataleptic strain GC. Influences of ontogenesis and generation of breeding. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova* = Russian Journal of Physiology. 2006;92(4): 499-505.
- Alekhina T.A., Prukudina O.I., Chugui V.F., Shikhevich S.G., Barykina N.N., Kolpakov V.G. Dual manifestation of catatonic reaction in rats. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova* = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 2005;55(4): 536-542.
- Alekhina T.A., Ryazanova M.A., Ukolova T.N., Sakharov D.U., Chugui V.F., Prokudina O.I. Neurohormonal changes during formation of latent inhibition in rats predisposed to catalepsy. *Neyrokhiimiya* = Neurochemistry (Moscow). 2008;25(3):211-216.
- Amstislavsky S.Ya., Buligina V., Maslova L.N., Alekhina T.A., Barykina N.N., Chugui V.F., Popova N.K., Kolpakov V.G. Effect of cross-fostering on some physiological and behavioral features in Wistar and GC (genetically cataleptic) rat strains. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova* = Russian Journal of Physiology. 2000;86(12):1630-1637.
- Barykina N.N., Alekhina T.A., Chugui V.F., Petrenko O.I., Plyusnina I.Z., Kolpakov V.G. Bipolar manifestation of cataleptic reactions in rats. *Genetika* = Genetics (Moscow). 2004;40(3):1-7.

- Barykina N.N., Alekhina T.A., Chugui V.F., Petrenko O.I., Popova N.K., Kolpakov V.G. Correlation between cataleptic freezing and prepulse inhibition of the startle reflex in rats. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004;34(4):413-416.
- Barykina N.N., Chepkasov I.L., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Selection of Wistar rats for predisposition to catalepsy. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 1983;19(12):2014-2021.
- Barykina N.N., Chugui V.F., Alekhina T.A., Riazanova M.A., Ukolova T.N., Sakharov D.G., Kolpakov V.G. Learning of rats predisposed to catalepsy in Morris water test. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2009;59(6):728-735.
- Belyaev D.K. Genetics and problems of animal selection. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 1966;10:36-48.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J. Hered.* 1979;70:301-308.
- Chugui V.F., Kolpakov V.G., Barykina N.N. Catalepsy and «nervousness» in rats: results of replicated selection. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2007;43(2):276-279.
- Fischer T.W., Siominski A., Tobin D.J., Paus R. Melatonin and the hair follicle. *J. Pineal Res.* 2008;44:1-15.
- Klochkov D.V., Alekhina T.A., Prokudina O.I. Age-specific features of estrous cycles and folliculogenesis in GC female rats selected by catatonic reactivity. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny=Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;151(2):182-185.
- Kolpakov V.G. Katatoniya u zhivotnykh: genetika, nefrofiziologiya, neyrokimiya [Catatonia in Animals: Genetics, Neurophysiology, Neurochemistry]. Novosibirsk, Nauka, 1990.
- Kolpakov V.G., Barykina N.N., Alekhina T.A., Ponomarev I.Yu. Some genetic animal models for comparative psychology and biological psychiatry. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 1996.
- Kolpakov V.G., Barykina N.N., Chepkasov I.L., Alekhina T.A., Parvez H. On animal models of schizophrenia. *Methods in Biogenic Amine Res.* 1983.
- Kolpakov V.G., Parvez S.H., Barykina N.N. A tentative evolutionary biological approach to the problem of schizophrenia. *Biogenic Amines*. 1986;3(4):299-319.
- Kolpakov V.G., Ricner M.S., Kornetov N.A., Samokhvalov V.P., Zalevskiy G.V., Korolenko C.P. Geneticheskie i evolyutsionnye problemy psikiatrii [Genetic and Evolutionary Problems of Psychiatry]. Novosibirsk, Nauka, 1985.
- Os'kina I.N., Prasolova L.A., Plyusnina I.Z., Trut L.N. The role of glucocorticoids in the appearance of coat depigmentation in animals selected for behavior. *Tsitologiya i genetika=Cytology and Genetics (Kiev)*. 2010;44(5):31-36.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human. *Behav. Genet.* 2009;39:202-212.
- Prasolova L.A., Gerbek Yu.E., Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Koshenko M.Iu., Kozhemyakina R.V., Os'kina I.N., Plyusnina I.Z. The effects of prolonged selection for behavior on the stress response and activity of the reproductive system of male Brown rats (*Rattus norvegicus*). *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2014;50(8):1-8.
- Prasolova L.A., Os'kina I.N., Plyusnina I.Z. The pleiotropic effect of selection for behavior on coat color in grey rats (*Rattus norvegicus*). *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2013;49(2):244-250.
- Ryazanova M.A., Igonina T.N., Alekhina T.A., Prokudina O.I. The increase in the proportion of nervous animals bred for catatonia: the participation of central adrenoreceptors in catatonic reactions. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2012;48(11):1141-1147.
- Shmal'gauzen I.I. *Faktory evolyutsii [Factors of evolution]*. Moscow, Nauka, 1968.
- Shul'ga V.A., Barykina N.N., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. The physiological characteristics of genetic predisposition to catalepsy in rats depending on the stage of selection. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova=Russian Journal of Physiology*. 1996;82(10/11):77-83.
- Trapezov O.V. A rise of new color phases in the American Mink (*Mustela vison Schreber*) in the course of selection for domestic behavior. *Scientifur*. 1997a;21(1):41-47.
- Trapezov O.V. Black crystal: a novel coat color mutant in the American Mink. *J. Hered.* 1997b;88(2):164-166.
- Trut L.N. Problema destabiliziruyushchego otbora v razviti. *Sovremennye kontseptsii evolyutsionnoy genetiki. Sbornik trudov [Problem of destabilization selection in development. Modern conceptions of evolutionary genetics. Proceedings]*. Novosibirsk, ICG, 2000.

Ассоциация несинонимичной замены в гене конденсина *NCAPG* с признаками яйца кур-несушек

О.Ю. Баркова, М.Г. Смарагдов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Одним из важнейших направлений исследований в области биологии и частной генетики сельскохозяйственных животных является идентификация генов, контролирующих проявление признаков, имеющих значение для практического использования в животноводстве. Для большинства этих признаков характерна широкая вариабельность регуляции экспрессии генов в отдельных локусах, которые называются локусами количественных признаков (QTL). Яйцо домашней птицы вызывало научный интерес на протяжении десятилетий в связи с его важностью для воспроизводства птицы, а также широкого применения в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. Выведение линий кур и кроссов является необходимым этапом для получения заданных признаков качества яйца. Результаты данной работы рекомендуются использовать при создании систем молекулярных маркеров для маркерной селекции несушек и получения новых линий и кроссов несушек с большей массой яйца. По сравнению с существующими традиционными системами селекции несушек по этому признаку маркерная селекция позволит исключить оценку генотипа петухов по потомству, что даст возможность существенно сократить время селекционной работы. Система маркеров будет представлять собой набор праймеров для выявления аллелей генов, оказывающих существенное влияние на указанный признак. Применение высокоэффективных систем молекулярных маркеров для прямой селекции по признакам яйца домашней курицы позволит добиться существенного прогресса в биотехнологии домашней птицы, избежать необходимости приобретения аналогичных систем зарубежного производства. В результате проведенной работы исследовали влияние гена конденсина *NCAPG* на признаки качества яйца домашней курицы. Обнаружены ассоциации аллелей SNP-маркера *rs14491030*, локализованного в экзоне 8 гена *NCAPG*, с признаком «вес яйца», $p < 0,001$, а также с упругой деформацией скорлупы яйца, $p < 0,026$. Выявлено, что однонуклеотидная несинонимичная замена аллеля А на G приводит к достоверному увеличению веса яйца. Этот маркер может быть рекомендован для использования в селекции кур-несушек. Расчеты относительной приспособленности генотипов SNP-маркера *rs14491030* свидетельствуют в пользу естественного отбора гетерозигот. Полученные результаты обсуждаются в связи с ролью комплекса конденсина I в компактизации хроматина и сегрегации хромосом.

Ключевые слова: QTL; однонуклеотидная несинонимичная замена; конденсин; куры; вес яйца.

Association of a non-synonymous substitution in the condensin *NCAPG* gene with traits of eggs in laying hens

O.Yu. Barkova, M.G. Smaragdov

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

One of the most important areas of research in the biology and genetics of farmed animals is one of identification of genes controlling the expression of traits with practical importance for animal breeding. For most of these characteristic features, wide variation in gene expression in specific loci, which are called quantitative trait loci (QTL), is typical. Eggs have been researched for decades due to their importance for the reproduction of birds, as well as for its widespread use in pharmaceutical, cosmetic and food industries. Breeding hens and cross-lines is a necessary step for producing eggs with desired quality. The results of this work are recommended for use to create systems of molecular markers for marker selection of layers and obtain new lines and cross hens with larger mass eggs. Compared to existing conventional systems of selecting layers on this basis, this will eliminate the assessment of the genotype of male progeny, which will significantly reduce breeding time. The system of markers will appear as a set of primers for detection of gene alleles that have a significant impact on the characteristics as above. The use of the molecular markers of high-performance systems for direct selection on the basis of domestic chicken eggs would lead to substantial progress in biotechnology poultry and help avoid having to purchase similar systems from outside the country. The association of the condensin *NCAPG* gene with the egg traits of domestic chicken has been studied. Associations of the SNP alleles of the *rs14491030* marker localized in exon 8 of the *NCAPG* gene with the trait "the weight eggs", $p < 0.001$, as well as with the elastic deformation of the egg shell, $p < 0.026$, have been found. It has been found that a single nucleotide nonsynonymous A→G substitution leads to a significant increase in egg weight. The marker SNP *rs14491030* with the observed significant effect on the trait «egg weight» can be recommended for use in breeding of laying hens. Calculations of the relative fitness of genotypes of the marker SNP *rs14491030*

suggest natural selection for heterozygotes. The results obtained are discussed in connection with the role of the canonical condensin complex in the compaction of chromatin and segregation of chromosomes.

Key words: QTL; single nucleotide non-synonymous mutation; condensing; chicken; egg weight.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Баркова О.Ю., Смарагдов М.Г. Ассоциация несинонимичной замены в гене конденсина *NCAPG* с признаками яйца кур-несушек. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):34-38. DOI 10.18699/VJ16.111

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Barkova O.Yu., Smaragdov M.G. Association of a non-synonymous substitution in the condensin *NCAPG* gene with traits of eggs in laying hens. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):34-38. DOI 10.18699/VJ16.111

Одним из важнейших направлений исследований в частной генетике сельскохозяйственных животных является идентификация генов, контролирующих проявление признаков, имеющих значение для практического использования в животноводстве. Признаки качества яйца контролируются многими генами, проявление которых можно выявить с помощью молекулярной генетики, способствуя, тем самым, ускорению процесса селекции. Молекулярная архитектура признаков часто соответствует классической модели Р. Фишера, когда признак определяется большим числом генов, каждый из которых имеет бесконечно малый эффект. Р. Фишер назвал ее «infinitesimal». Выявить такие гены крайне затруднительно, и использование небольшого числа картированных генов не имеет практического применения, так как их суммарное влияние мало. Некоторые признаки контролируются генами с мажорным эффектом. Такие гены можно использовать для молекулярной селекции. По признакам качества яйца за последние 15 лет была накоплена большая база данных по картированию локусов количественных признаков (QTLs) с помощью микросателлитов (<http://www.animalgenome.org/>). Однако практическое использование этих данных в силу разных причин не нашло применения (Necsulea, Kaessmann, 2014). Метод полногеномного ассоциативного анализа с помощью однонуклеотидных замен (GWAS) позволяет точно локализовать гены-кандидаты и в некоторых случаях определить замены нуклеотидов, непосредственно влияющие на признак.

Предпосылкой выбора SNP *rs14491030* послужил тот факт, что в работе А. Волк с коллегами (Wolc et al., 2012) был выявлен мажорный QTL в хромосоме 4, оказывающий сильное влияние на вес яйца домашней курицы. Он ассоциировал с изменчивостью веса яйца до 38,5 % при достоверности $p < 0,03$. Генотипирование осуществлялось с помощью SNP чипа 60К. Всего использовано 24,425 SNP на поголовье 2900 кур.

При работе с базой данных NCBI нами было установлено, что *rs14491030* находится в экзоне 8 гена *NCAPG* (не-SMC субъединица CAP-G комплекса конденсина I), который может определять эффект данного QTL. Поскольку *rs14491030* является миссенс-мутацией с заменой валина на аланин, то существует основание рассматривать данную замену как кандидата на мутацию, непосредственно влияющую на признак.

Конденсины являются субъединичными белковыми комплексами, играющими фундаментальную роль в структурной и функциональной организации хромосом. Впервые конденсин (теперь известный как конденсин I) был выявлен из экстракта яиц шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* как основной компонент хромосом, играющий важную роль в их сборке. Он присутствует в хромосомах как дрожжей, так и человека (Hirano et al., 1997; Sutani et al., 1999).

Недавние исследования показали, что конденсины I и II многофункциональны и участвуют в регуляции экспрессии генов, рекомбинации и репарации (Hirano, 2005; Wood et al., 2010).

Конденсины I и II содержат одну и ту же пару субъединиц, SMC2 и SMC4, принадлежащих к белкам структурного поддержания хромосом (SMC) большого семейства хромосомной АТФазы (Hirano, 2006). Также каждый комплекс содержит уникальный набор из трех не-SMC субъединиц (CAP-D2, CAP-G, и CAP-H для конденсина I, и CAP-D3, CAP-G2, и CAP-H2 для конденсина II). CAP-D2 и CAP-D3 (CAP-G и CAP-G2) частично гомологичны, так как имеют вырожденный мотив повторов, называемый HEAT-повторами. Среди трех не-SMC субъединиц, две (CAP-D2 и CAP-G) вовлечены в белок-белковые взаимодействия (Neuwald, Hirano, 2000). Общеизвестно, что транскрипция прекращается во время М-фазы митоза, но явление закладки (bookmarking) комплекса конденсина I во время G2 и М-фаз может создать позиционную память, так что транскрипционные факторы способны быстро собираться в промоторах генов в G1-фазе. Кроме того, было высказано предположение, что транскрипционный фактор HSF2, связанный с CAP-G-субъединицей, заставляет протеинфосфатазу 2A дефосфорилировать (тем самым, деактивировать) комплексы конденсина, способствуя связыванию других транскрипционных факторов с промоторами генов в G1-фазе (Kim et al., 2013). Таким образом, присутствие конденсина I в промоторах может индуцировать транскрипцию генов в G1-фазе. Кроме того, конденсин I принимает участие в регуляции экспрессии генов, которые сохраняют активность в М-фазе митоза (Xing et al., 2008). Однако основной функцией конденсина I и II *in vivo* является компактизация хроматина и разделение хроматид в ходе их митотической сегрегации.

Показано, что ген *NCAPG* влияет на рост людей (Pruce et al., 2011) и QTL, соответствующий данному гену в хро-

мосоме ЕАС 3 лошадей, определяет такие признаки, как «высота в холке и крупе», «структура ног», «вентральная граница нижней челюсти», «правильность походки и постановки ног» у лошадей (Signer-Hasler et al., 2012).

Ген *NCAPG*, локализованный на хромосоме 6 *Bos taurus*, определяет преднатальный и постнатальный рост, а также отложение жира у крупного рогатого скота (Eberlein et al., 2009), влияет на размер и вес тела (Setoguchi et al., 2009), потребление корма и мясную продуктивность (Lindholm-Perry et al., 2011). Показано, что синтез аргинина и его метаболита диметиларгинина ассоциирован с мутацией в гене *NCAPG* (Weikard et al., 2010). Эту аминокислоту часто используют как пищевую добавку из-за важной регуляторной роли аргинина и его метаболитов в преднатальном и постнатальном росте у многих видов животных (Wu et al., 2009). Таким образом, ген *NCAPG* имеет тенденцию оказывать влияние на признаки роста животных. Исследований о влиянии *NCAPG* на признаки домашней курицы ранее не проводилось.

Целью работы было выявление ассоциации *rs14491030* в гене конденсина *NCAPG* с признаками качества яйца домашней курицы.

Материалы и методы

Для проведения экспериментов использованы куры породы Род Айленд мясо-яичного направления, содержащиеся в ФГУП «Генофонд» на базе ФГБНУ ВНИИГРЖ. Окраска оперения кур темно-коричневая. Стержень пера окрашен в сочный красноватый цвет, подпух светло-коричневый, перья хвоста черные с зеленоватым отливом. Пигментация скорлупы коричневая. Особенности породы является наличие у нее гена золотистости, сцепленного с полом. При получении помесей этих кур с другими породами и кроссами можно разделить суточных цыплят по полу (аутосексные цыплята). Данная порода активно используется в настоящее время при получении промышленных кроссов кур. В работе использовали следующие признаки: 1) толщина скорлупы – средняя толщина скорлупы яйца в мкм; 2) вес яйца (30 нед) – средний вес яйца у кур соответствующего возраста в граммах; 3) упругая деформация (30 нед) – средняя деформация скорлупы яиц без нарушения ее целостности в мкм под воздействием груза весом 500 г, несенных курами соответствующего возраста.

Из 241 образца крови была выделена ДНК с помощью фенол-хлороформного метода.

Для выявления локализации *rs14491030* нами был проведен анализ *in silico* при помощи опции Map View в базе данных NCBI. Дизайн аллелеспецифических праймеров для генотипирования кур по аллелям *rs14491030*, находящимся в гене *NCAPG*, проводили на основании информации базы данных сети интернет (www.nlm.ncbi.nih.gov) при помощи компьютерной программы PRIMER_3 (http://bioinfo.ut.ee/cgi-bin/primer3-0.4.0/primer3_results.cgi). Величина амплифицируемого фрагмента была 204 п.н. для праймера Up_A и 344 п.н. – для праймера Up_G. Проверка полученных последовательностей праймеров на специфичность и отсутствие возможной внутригенной гомологии была проведена при помощи пакета программ BLAST.

Полимеразная цепная реакция осуществлялась с аллелеспецифическими праймерами – по два альтернативных и универсальных праймера.

Аллелеспецифические праймеры для генотипирования кур по аллелям *rs14491030* (полиморфные сайты выделены):

Up_A: CTTCTTCCTCACAACCTTTCAGTTCCAA
Dn: GTGGTGGTCTGCTATAACACTGTCTG
Up_G: CTTCTTCCTCACAACCTTTCAGTTCCAG
Dn: TGTGTTAAGCTTTGACTCATATCAGACC

Аmplификацию ДНК при помощи ПЦР проводили на амплификаторе IQ-5 (Bio-Rad, США) с использованием реактивов СибЭнзим в следующем режиме: один цикл – 95 °C – 3 мин; 35 циклов – 95 °C – 1 мин, 60 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин; один цикл – 72 °C – 7 мин; 4 °C – хранение.

Разделение фрагментов осуществляли с помощью электрофореза в 1,5 %-м агарозном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в проходящих УФ-лучах. Размеры фрагментов ДНК определяли при сравнении их с размерами фрагментов маркера ДНК.

Расчет приспособленности осуществляли по следующим формулам (Айала, 1984): $W = F_n/F_t$; $W_{отн} = W_{гомозиготы}/W_{AG}$; $S = 1 - W_{отн}$; $F_{равновесная} = S_{AA}/(S_{AA} + S_{GG})$, где W – приспособленность, F_n – наблюдаемая частота генотипа, F_t – теоретическая частота генотипа, $W_{отн}$ – относительная приспособленность, $W_{гомозиготы}$ – приспособленность гомозиготных кур, W_{AG} – приспособленность гетерозиготных кур, S – коэффициент отбора, $F_{равновесная}$ – равновесная ожидаемая частота, S_{GG} – коэффициент отбора генотипа *GG*, S_{AA} – коэффициент отбора генотипа *AA*.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, находящегося в пакетах программы SigmaPlot 9 (Systat Software Inc.). Так как распределение признаков для некоторых генотипов не было нормальным, то для вычисления уровня достоверности использовали ранговый вариант однофакторного дисперсионного анализа (Крускала–Уоллиса).

Результаты и обсуждение

Проведенный нами анализ *in silico* при помощи опции Map View в базе данных NCBI показал, что *rs14491030* расположен в экзоне 8-го гена *NCAPG* в позиции 75486534 п.н. При этом была выявлена замена валина на аланин, что позволяет классифицировать *rs14491030* как миссенс-мутацию. Напомним, что ген *NCAPG* кодирует не-SMC субъединицу CAP-G комплекса конденсина I.

При проведении дисперсионного анализа данных для генотипов *AG*, *AA* и *GG* маркера *rs14491030* у кур было выявлено достоверное различие генотип–признак для признаков «вес яйца» $p < 0,001$ и «упругая деформация» $p < 0,026$ (табл. 1). Эффект замещения аллеля *A* на *G* составил 7 г ($p < 0,05$) для признака «вес яйца» и 2,5 мкм ($p < 0,05$) – для «упругая деформация скорлупы яйца». Для признака «упругая деформация скорлупы яйца» эффект замещения аллеля составил менее одной сигмы ($\sigma = 4,7$), следовательно, наблюдается минорный плейотропный эффект (см. ниже). Эффект гена *NCAPG* на вес яйца составил порядка одной сигмы ($\sigma = 6,0$).

Table 1. Association of *rs14491030* with parameters of domestic chicken eggs

Trait	Number of hens	Genotype	Mean ± error of the mean	Standard deviation	Median	<i>p</i>
Egg weight	14	GG	55.5 ± 1.5	6.0	54.3	< 0.001
	57	AA	54.6 ± 0.7	5.1	53.9	
	170	AG	60.6 ± 0.4	6.0	61.6	
Elastic deformation	14	GG	21.5 ± 1.8	6.4	22.6	< 0.026
	57	AA	22.1 ± 0.6	4.6	22.4	
	170	AG	20.0 ± 0.5	6.5	20.0	
Eggshell thickness	14	GG	341 ± 8	32	335	< 0.18
	57	AA	348 ± 5	35	355	
	170	AG	352 ± 2	31	355	

Table 2. Fitnesses of the three genotypes for *rs14491030* in the *NCAPG* gene

Genotype	AA	AG	GG	All	The frequency of allele G	Conformity of genotype frequency distribution to the Hardy–Weinberg law
The observed frequency of the genotype (F_H)	0.237	0.750	0.058	1	0.411	< 10 ⁻⁶
The expected frequency of the genotype (F_T)	0.346	0.484	0.169	1	0.411	
Fitness (W)	0.68	1.549	0.343			
Relative fitness	0.439	1	0.221			
The coefficient of selection (S)	0.581		0.779		Predicted equilibrium frequency of allele G = 0.427	

В настоящее время существует несколько методов выявления QTL, обусловленных применяемыми маркерами. Один из них основан на смешанной модели (Mixed Model) с использованием микросателлитов как маркеров. В этом случае величина влияния QTL на признак измеряется с помощью либо генетической вариации, либо стандартного отклонения. Мощность этого анализа не велика (Weller, 2012). Можно выявить QTLs не менее 0,1–0,2 сигмы. QTLs с эффектом 0,6–1,5 сигмы считаются мажорными (Weller, 2012). Выявление QTLs с помощью SNPs-чиповой технологии осуществляется полногеномным ассоциативным анализом (GWAS). В этом случае эффект QTL можно косвенно оценить по величине *p* – value (ошибка первого рода). Чем меньше значение *p*, тем больше влияние QTL на признак. Наш вариант оценки рассчитывается как разность значений признака между генотипами, измеренная в шкале стандартного отклонения. Точность такой оценки зависит от числа животных, использованных в анализе. Во введении статьи подчеркивается, что генетическая архитектура большинства количественных признаков определяется минорными QTL. Влияние гена *NCAPG* на вес яйца можно отнести к мажорным генам. Так как его эффект составляет одну сигму, то имеет смысл использовать *rs14491030* в качестве селекционного маркера.

Гетерозиготные куры несут яйца большего веса, чем гомозиготные и их численность в 3(12) раза больше,

чем гомозиготных кур *AA*(*GG*). Частоты генотипов для *rs14491030* с большой достоверностью не соответствуют распределению Харди–Вайнберга (табл. 2).

Разведение кур из ФГУП «Генофонд» осуществляется без селекции по какому-либо признаку. Учитывая, что ген *NCAPG* относится к house keeping генам, определяющим общеклеточные функции, генотип *GG* SNP *rs14491030* может обуславливать уменьшение приспособленности особей, что и приводит к низкой частоте особей с этим генотипом.

Рассчитаем относительную приспособленность трех генотипов кур (табл. 2). Предположим, что происходит селекция особей в пользу гетерозигот. Тогда из данных табл. 2 следует, что относительная приспособленность гомозиготных *GG* кур значительно снижена по сравнению с гетерозиготными курами и коэффициент отбора больше для гомозиготных кур *GG* по сравнению с гомозиготными *AA*. Таким образом, предположение о естественной селекции в пользу гетерозиготных кур не лишено основания. Выяснение, благодаря каким компонентам приспособленности осуществляется отбор в пользу гетерозиготных кур, требует дополнительных экспериментов. Преимущество гетерозиготных генотипов по гену *NCAPG* (мутация *rs14491030*) над гомозиготными генотипами может быть использовано при селекции кур на гетерозиготность. Следует отметить, что ранее ряд авторов (Tuiskula-Haavisto et

al., 2002; Sasaki et al., 2004; Schreiweis et al., 2005; Goraga et al., 2011) картировали несколько QTLs на хромосоме 4 домашней курицы, определяющих признаки яйца.

Результаты нашего анализа подтверждают данные А. Волк с коллегами (Wolc et al., 2012) об ассоциации *rs14491030* с весом яйца кур, полученные с помощью полногеномного ассоциативного анализа GWAS. Таким образом, исходя из результатов цитированных выше авторов и наших данных, можно предположить, что ген *NCAPG* ответственен за эффекты QTLs у домашней курицы. При этом, в соответствии с нашими данными, ген *NCAPG* имеет плейотропный эффект на упругую деформацию яйца и относительную приспособленность гетерозиготных кур. Для заключения о влиянии гена *NCAPG* на признаки яйца следует провести анализ неравновесия по сцеплению между SNP-маркерами в этом гене. Если неравновесие по сцеплению между SNP-маркерами *rs14491030* и SNPs на краях гена *NCAPG* не будет превышать значения $r^2 = 0,05$, то тогда можно утверждать, что этот ген причастен к наблюдаемым эффектам. Тем не менее маркер *rs14491030* может быть рекомендован для использования в селекции кур-несушек по признаку «вес яйца».

Исходя из функциональных характеристик комплекса конденсина I, приведенных выше, мы предполагаем следующее объяснение влияния мутации *rs14491030* в гене *NCAPG* на вес яйца кур. Субъединица CAP-G, кодируемая геном *NCAPG*, входящая в комплекс конденсина I, расположенного в прототорах генов, участвующих в сегрегации хромосом в М-фазе митоза и определяющих скорость вступления клетки в G1-фазу, может влиять на продолжительность клеточного цикла. Уменьшение продолжительности клеточного цикла приведет к увеличению числа клеток и накоплению массы продуктов, синтезируемых клетками, что, в свою очередь, приведет к увеличению веса яйца. При этом степень проявления гена конденсина *NCAPG* будет зависеть от других генов – участников генных сетей, в которых он присутствует. Их влияние будет определяться породой, популяцией и линией кур, а также природной средой, как это следует из генетики количественных признаков.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ayala F. Vvedenie v populatsionnyu genetiku [Introduction to Population Genetics]. Moscow, Mir, 1984.
- Eberlein A., Takasuga A., Setoguchi K., Pfuhl R., Flisikowski K., Fries R., Klopp N., Furbass R., Weikard R., Kuhn C. Dissection of genetic factors modulating fetal growth in cattle indicates a substantial role of the non-SMC condensin I complex, subunit G (*NCAPG*) gene. *Genetics*. 2009;183(3):951-964.
- Goraga Z.S., Nassar M.K., Brockmann G.A. Quantitative trait segregating in crosses between New Hampshire and White Leghorn chicken lines: I. egg production traits. *Anim. Genet.* 2011;43:183-189.
- Hirano T. Condensins: Organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* 2005;15:265-275.
- Hirano T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7:311-322.
- Hirano T., Kobayashi R., Hirano M. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell*. 1997;89:511-521.
- Kim J.H., Zhang T., Wong N.C., Davidson N., Maksimovic J., Oshlack A. Condensin I associates with structural and gene regulatory regions in vertebrate chromosomes. *Nat. Commun.* 2013;4:2537.
- Lindholm-Perry A.K., Sexton A.K., Kuehn L.A., Smith T.P., King D.A., Shackelford S.D., Wheeler T.I., Ferrel C.L., Jenkins T.G., Snelling W.M., Freetly H.C. Association, effects and validation of polymorphisms within the *NCAPG* – *LCORL* locus located on BTA6 with feed intake, gain, meat and carcass traits in beef cattle. *BMC Genetics*. 2011;12:103.
- Necsulea A., Kaessmann H. Evolutionary dynamics of coding and non-coding transcriptomes. *Annu. Rev. Genet.* 2014;15:734-748.
- Neuwald A.F., Hirano T. HEAT repeats associated with condensins, cohesins and other chromosome-related complexes. *Genome*. 2000;10:1445-1452.
- Pryce J.E., Hayes B.J., Bolormon S., Goddard M.E. Polymorphic regions affecting human height also control stature in cattle. *Genetics*. 2011;187:981-984.
- Sasaki O., Odawara S., Takahashi H., Nirasava K., Oyama Y., Yamamoto R., Ishi K., Nagamine Y., Takeda H., Kobayashi E., Furukawa T. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens. *Anim. Genet.* 2004;35:188-194.
- Schreiweis M.A., Hester P.Y., Settar P., Moody D.E. Identification of quantitative trait loci associated with egg quality, egg production, and body weight in F2 resource population of chickens. *Anim. Genet.* 2005;37:106-112.
- Setoguchi K., Furuta M., Hirano T., Nagao T., Watanabe T., Sugimoto Y., Takasuga A. Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in *NCAPG* as a positional candidate. *BMC Genetics*. 2009;10:43.
- Signer-Hasler H., Flury C., Haase B., Simianer H., Leeb T., Rieder S. A genome-wide association study reveals loci influencing height and other conformation traits in horses. *J. Pone*. 2012; 7(5):372-382.
- Sutani T., Yuasa T., Tomonaga T., Dohmae N., Takio K., Yanagida M. Fission yeast condensin complex: Essential roles of non-SMC subunits for condensation and cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev.* 1999;13:2271-2283.
- Tuiskula-Haavisto M., Honkatukia M., Vilkkii J. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers. *Poultry Sci.* 2002;81:919-927.
- Weikard R., Almaier E., Suhre K., Weinberg K.M., Hammon H.M., Albrecht E., Setoguchi K., Takasuga A., Kuhn C. Metabolomic profiles indicate distinct physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos Taurus* growth and lipid deposition. *Physiol. Genomic*. 2010;42A(2):79-88.
- Weller J.I. Quantitative trait loci analysis in animals, second edition. L.: CAB International, 2012.
- Wolc A., Arango J., Settar P., Fulton J.E., O'Sullivan N.P., Preisinger R., Habier D., Fernando R., Garrick D.J., Hill W.G., Dekkers J.C. Genome – wide association analysis and genetic architecture of egg weight and egg uniformity in layer chickens. *Animal Genetics*. 2012;43:87-96.
- Wood A.J., Severson A.F., Meyer B.J. Condensin and cohesin complexity: The expanding repertoire of functions. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11:391-404.
- Wu G., Bazer F.W., Davis T.A., Kim S.W., Li P., Rhoads J.M., Smith S.B., Spencer T.E., Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009;37(1):153-168.
- Xing H., Vanderford N.L., Sarge K.D. The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:1318-1323.

Скорость роста и продуктивность бройлерного кросса кур с разными полиморфными типами гена миостатина

Н.В. Дементьева, О.В. Митрофанова, В.И. Тыщенко, В.П. Терлецкий, А.Ф. Яковлев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Поиск однонуклеотидных замен (SNP) в гене миостатина является перспективным направлением исследований, так как этот ген вовлечен в формирование важных биологических и продуктивных свойств у кур. С помощью метода ПЦР-ПДРФ проведен анализ частот аллелей и генотипов у кур породы корниш промышленной линии Г5 кросса «Смена-8». Использовали две пары праймеров, позволяющих получить ПЦР-продукт в участке гена миостатина. Рассмотрены две однонуклеотидные замены в экзоне 1 гена миостатина: G/A в положении *MST2109* и G/C в положении *MST2244*. По частоте встречаемости обнаружено существенное преобладание в локусе *MST2244* дезоксиинуклеозидтрифосфата G над C и в локусе *MST2109* – A над G. Различий по показателям продуктивности между генотипами при замене *MST2109* обнаружено не было. При анализе аллельного разнообразия по локусу *MST2244* обнаружены достоверные различия по живой массе цыплят в возрасте 7 дней между генотипами CC и G₂G₂ ($p < 0,01$), CG₂ и G₂G₂ ($p < 0,05$). Особи с генотипом G₂G₂ (203,52 г) превосходили животных с генотипами CC (179,5 г) и CG₂ (193,95 г) по живой массе в 7 дней. Выявлены различия между генотипами CC и G₂G₂ по живой массе в 33 дня ($p < 0,05$). Таким образом, проведенные исследования позволили оценить частоту встречаемости аллелей в гене миостатина линии Г5 породы корниш. Установленные закономерности дадут возможность учитывать определенные генотипы кур по гену миостатина для ускорения селекционного процесса.

Ключевые слова: куры; полиморфизм; ген миостатина; ПЦР-ПДРФ; аллель; генотип.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Тыщенко В.И., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф. Скорость роста и продуктивность бройлерного кросса кур с разными полиморфными типами гена миостатина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):39-43. DOI 10.18699/VJ16.154

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dementeva N.V., Mitrofanova O.V., Tyshchenko V.I., Terletskiy V.P., Yakovlev A.F. The rate of weight gain and productivity of chicken broiler cross with various polymorphic types of myostatin gene. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):39-43. DOI 10.18699/VJ16.154

ORIGINAL ARTICLE

Received 05.05.2015 г.

Accepted for publication 27.07.2015 г.

© AUTHORS, 2016

The rate of weight gain and productivity of chicken broiler cross with various polymorphic types of myostatin gene

N.V. Dementeva, O.V. Mitrofanova, V.I. Tyshchenko, V.P. Terletskiy, A.F. Yakovlev

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

The search for single nucleotide polymorphisms (SNP) in the myostatin gene is a promising direction of research as this gene is involved in the development of important biological and productive traits in chicken. Using PCR-RFLP technique, an analysis of allele and genotype frequencies in Cornish chicken breed of G5 line of Smena-8 cross has been conducted. Two pairs of primers allowing PCR product to be obtained in the myostatin gene have been used. Two single nucleotide substitutions on exon 1 of the myostatin gene have been under investigation: G/A in *MST2109* and G/C in *MST2244*. A significant predominance of deoxynucleotide G in *MST2244* over C and deoxynucleotide A over G in *MST2109* has been observed. Differences in productive traits between genotypes in *MST2109* were not detected. Analysis of allelic variability by *MST2244* locus showed statistically significant differences in live weight at the age of 7 days between CC and G₂G₂ genotypes ($p < 0.01$), CG₂ and G₂G₂ ($p < 0.05$). G₂G₂ individuals (203.52 g) were significantly heavier than CC (179.5 g) and CG₂ (193.95 g) chickens at the age of 7 days. Statistically significant differences between the CC and G₂G₂ genotypes in live weight at the age of 33 days have been revealed ($p < 0.05$). Thus, this research has led to a better understanding of allele frequencies in the myostatin gene in line G5 of Cornish breed. The results obtained will allow particular myostatin gene-based genotypes to be taken into account for accelerating the breeding process in the broiler poultry industry.

Key words: chicken; polymorphism; myostatin gene; PCR-RFLP; allele; genotype.

Изучение полиморфизма генов, связанных со скоростью роста и развития организма, актуально для многих видов сельскохозяйственных животных, особенно для бройлерных кроссов птицы, обладающей высокой скоростью прироста живой массы. В мясном птицеводстве отбор ведется сразу по нескольким признакам: скорости роста, уменьшению абдоминального жира, оплате корма, которые взаимодействуют друг с другом. Молекулярные маркеры способны стать хорошим дополнительным инструментом для успешного отбора птицы с нужными качествами.

В проведенных ранее исследованиях по определению однонуклеотидных замен в гене гормона роста у кур ФГУП ППЗ СГЦ «Смена» найдена их связь с хозяйственными признаками (Яковлев и др., 2013). Выявление у миостатина (*MSTN*) необычной способности ингибировать развитие мускулатуры у высших позвоночных вызвало всплеск интереса к нему (McPherron et al., 1997). Блокирование пути от гена *MSTN* к мышечным клеткам приводит к выраженным позитивным эффектам. Так, у многих видов животных были обнаружены мутации в этом гене, приводящие к увеличению мышечной массы в два раза. Ярким примером оказались представители бельгийской голубой породы крупного рогатого скота, обладающие фенотипом двойной мускулатуры. (Kambadur et al., 1997; McPherron, Lee, 1997; Grobet et al., 1998). Миостатин оказался вовлечен в процессы старения, а также причастен к возникновению кахексии при ряде патологий. У высших позвоночных *MSTN* тканеспецифичен, его синтез происходит в скелетных мышцах, на которые он и оказывает биологические эффекты (Thomas et al., 2000; McCroskery et al., 2003).

У кур ген *MSTN* состоит из трех экзонов и двух интронов. Первый, второй и третий экзоны содержат 373, 374 и 1567 п. н. (п. н. – пар нуклеотидов) соответственно (Baron et al., 2002). Начиная с 2000 г. появились работы, направленные на поиск однонуклеотидных замен (SNP) в кодирующей части гена миостатина, с целью обнаружения их сцепления с хозяйственно полезными признаками (Ye et al., 2007; Zhang et al., 2012; Hu et al., 2013). Основная цель настоящей работы – определение частот встречаемости различных генотипов замен в локусах *MST2109* и *MST2244* гена миостатина у бройлерной линии кур с регистрацией уровня показателей роста и продуктивности.

Материалы и методы

Материалом для работы послужила ДНК, выделенная из крови 245-дневных кур и петухов породы корниш линии Г5 кросса «Смена-8» из ФГУП ППЗ СГЦ «Смена». ДНК выделяли по стандартной методике с использованием фенольно-детергентного метода (Тыщенко и др., 2002; Дементьева и др., 2003). Для анализа было взято 140 голов кур, отобранных из племенного ядра линии Г5. Кровь отбирали из подкрыльцовой вены в микропробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 30 мкл 0,5 М ЭДТА. До исследования образцы хранили в холодильнике при -20°C . Генотипы определяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием следующих двух пар праймеров: *MSTrg* (прямой 5'-AAC-CAA-TCG-TCG-GTT-TTG-AC-3', обрат-

ный 5'-CGT-TCT-CTG-TGG-GCT-GAC-TA-3') и *MSTex1* (прямой 5'-TAG-TCA-GCC-CAC-AGA-GAA-CG-3', обратный 5'-CGA-AAG-CAG-CAG-GGT-TGT-TA-3') (Ye et al., 2007). С их помощью получали два участка экзона 1 гена миостатина (*AF346599*). Продукты амплификации обрабатывали с помощью эндонуклеаз рестрикции *HpaII* и *HinPII* (Thermo Fisher Scientific, Литва). В результате были изучены две однонуклеотидные замены: G/A в положении 2109 и G/C в положении 2244 гена миостатина (rs313744840, rs316247861).

ПЦР проводили на амплификаторе «BioRad» (США) с использованием смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl pH 8,6, 2,5 мМ MgCl₂, 16,6 мМ NH₄OH, 0,125 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 50–100 нг геномной ДНК и 2,5 ед. Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) в объеме 10 мкл при режиме 35 циклов, каждый цикл: 30 с – 94 °С, 30 с – 60 °С, 30 с – 72 °С. Генотипы определяли с помощью анализа ПДРФ с применением эндонуклеазы *HpaII* для замены *MST2109* и *HinPII* для замены *MST2244*. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в течение 1 ч при рабочем напряжении 7,5 В/см в ТВЕ буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ ЭДТА), в 1,5 %-м агарозном геле, содержащем флюоресцентный краситель бромистый этидий. В качестве маркера, позволяющего оценить длину фрагментов ДНК на геле, использовали pUC19/*MspI*. Сигнал фотографировали в системе геле-документации фирмы Кодак.

Рассчитывали частоту встречаемости генотипов и проверяли ее на отклонение от равновесия Харди – Вайнберга с применением критерия χ^2 (Животовский, 1991).

Различия между генотипами по продуктивным признакам птицы определяли путем вычисления достоверности разности между средними значениями количественного признака в выборках особой разного генотипа, рассчитанными в пакете программ Excel. Расчет основывался на критериях Пирсона, Шапиро – Уилка и достоверности *t* Стьюдента.

Для каждой исследованной особи были рассчитаны следующие показатели: живая масса в 7 дней (г); живая масса в 33 дня (г); половая зрелость (возраст снесения первого яйца); масса яиц в 210 и 364 дня (г); яйценоскость за 210 и 365 дней (шт.); доля оплодотворенных яиц (%); выводимость цыплят (%). Массу птицы определяли на весах марки «Госметр». Выводимость была рассчитана как отношение количества выведенных цыплят к количеству оплодотворенных яиц. Долю оплодотворенных яиц (%) вычисляли по отношению к общему числу заложенных на инкубацию яиц.

Результаты

На рисунке представлены результаты, полученные после использования эндонуклеаз рестрикции продуктов ПЦР и электрофореза. Особи с различным генотипом по анализируемому нами заменам четко отличались друг от друга.

При использовании пары праймеров *MSTrg* длина амплифицируемого фрагмента составила 297 п. н. После обработки эндонуклеазой *HpaII* наблюдали следующую картину распределения фрагментов: генотип *G₁A* иденти-

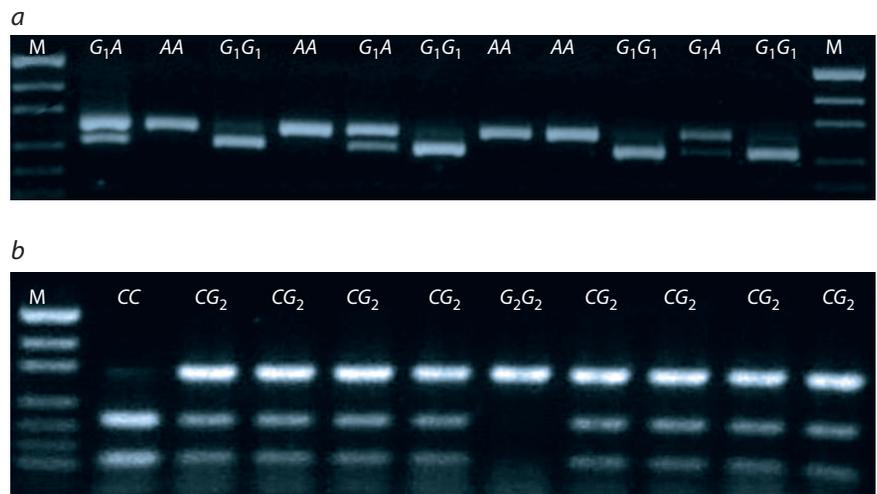
фицировали при наличии фрагментов 297, 260 и 37 п. н.; генотип G_1G_1 – при наличии фрагментов 260 и 37 п. н., а генотип AA соответствовал амплификату. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали рUC19/*MspI*.

Пара праймеров MSTex1 позволяла получить фрагмент длиной 320 п. н. После обработки рестриктазой *HinPI* обнаруживали три генотипа. Гетерозиготы CG_2 отличались наличием трех фрагментов: 320, 203 и 117 п. н., гомозиготы CC имели фрагменты 203 и 117 п. н., а у особей с генотипом G_2G_2 амплифицированный в ходе ПЦР фрагмент оставался не расщепленным ферментом рестрикции и составлял 320 п. н.

На основании полученных электрофореграмм были рассчитаны частоты генотипов и аллелей по заменам *MST2109* и *MST2244* (табл. 1). В случае с заменой в положении 2109 наблюдали значительное преобладание гетерозиготных генотипов AG_1 (57 %). Одну треть исследованных животных составили обладатели генотипа AA . При изучении замены в положении 2244 число гетерозигот CG_2 и гомозигот G_2G_2 оказалось практически одинаковым и составило, соответственно, 49 и 45 % от общего числа исследованных особей.

Показатели продуктивности кур в зависимости от генотипа при замене *MST2109* представлены в табл. 2. Достоверных различий между генотипами обнаружено не было. Можно отметить тенденцию увеличения живой массы в зависимости от наличия аллеля *A*. Так, особи генотипа AA имели наибольшую живую массу в 7 и 33 дня, а также лучшую яйценоскость за 210 и 364 дня.

Связь генотипов по *MST2244* с хозяйственно полезными признаками показана в табл. 3. Обнаружены достоверные различия по живой массе в 7 дней между носителями генотипов CC и G_2G_2 ($p < 0,01$), CG_2 и G_2G_2 ($p < 0,05$). Цыплята с генотипом G_2G_2 превосходили животных с генотипами CC и CG_2 по живой массе в 7 дней. Достоверные различия с вероятностью $p < 0,05$ выявлены между особями с генотипами CC и G_2G_2 по живой массе в 33 дня. Следует отметить, что куры с генотипом G_2G_2 отличались высокой яйценоскостью



Genotyping of nucleotide polymorphisms in the chicken myostatin gene by PCR-RFLP: (a) G/A at position *MST2109*, (b) G/C at position *MST2244*.

M, marker; AA, G_1G_1 , CC, G_2G_2 , homozygous genotypes; G_1A , CG_2 , heterozygous genotypes.

(за 210 и 364 дня), но разница незначительна. Влияние генотипа на другие продуктивные показатели установлено не было.

Обсуждение

Промышленная птица линии Г5 породы корниш, разводимая в племенном птицеводческом заводе «Смена», представляет собой сильно отселекционированную по живой массе популяцию. Это связано с дальнейшим использованием этой линии в промышленном птицеводстве в качестве отцовской формы, которая в скрещивании с курами породы плимутрок дает эффект гетерозиса, проявляющийся в хорошей скорости роста гибридной птицы.

Метод ПЦР-ПДРФ позволяет генотипировать животных на наличие однонуклеотидных замен с высокой точностью и низкими затратами. Поэтому он удобен для оценки большого поголовья, что особенно актуально в птицеводстве. В изучаемой популяции кур породы корниш наблюдался полиморфизм по изученным заменам. При этом, несмотря на значительное количество гетерозигот, преобладали гомозиготы AA по замене *MST2109* и G_2G_2 по замене *MST2244*. Это, вероятно, обусловлено жестким отбором, которому подвергается популяция кур. Генотипы G_1G_1 и CC , имеющие низкие показатели живой массы, малочисленны.

Объем мышечной массы связан с работой гена миостатина. Миостатин – белок, подавляющий рост и дифференцировку мышечной ткани в организме. Он выступает в качестве негативного регулятора массы скелетных мышц и действует по принципу обратной связи. При возрастании мышечной массы увеличивается секреция миостатина, что тормозит дальнейший рост мышц. Однонуклеотидные замены в этом гене в некоторых случаях связаны со скоростью роста, репродуктивными показателями и качеством мяса (Kambadur et al., 1997; McPherron, Lee, 1997; Grobet et al., 1998).

В регуляторной области гена миостатина у кур имеются три SNPs, которые отличаются частотами аллелей между породами (Zhiliang et al., 2004). Было обнаружено, что в поколении F_2 от скрещивания бройлеров с шелковистыми курами гомозиготные генотипы AA и BB имеют более высокую массу брюшного жира, чем генотип AB .

С развитием молекулярно-генетических методов анализа начались попытки поиска взаимосвязей между отдельными нуклеотидными заменами и хозяйственно полезными признаками. Эти исследования особенно актуальны в птицеводстве, где идет быстрая смена поколений и результаты направленного отбора можно наблюдать достаточно быстро. Порода корниш прошла жесткий

Table 1. Frequencies of alleles and genotypes found at the *MST2109* и *MST2244* loci of the myostatin gene in Cornish breed cross Smena-8 chicken

Locus	Genotype			Allele		χ^2
<i>MST2109</i>	G_1G_1 ($n = 11$)	AG_1 ($n = 79$)	AA ($n = 48$)	G_1	A	0.122
	0.08	0.57	0.35	0.37	0.63	
<i>MST2244</i>	CC ($n = 8$)	CG_2 ($n = 68$)	G_2G_2 ($n = 64$)	C	G_2	0.031
	0.06	0.49	0.45	0.31	0.69	

Table 2. Comparison of productive traits in chicken of Cornish breed cross “Smena-8” of different genotypes for the myostatin gene (*MST2109*-SNP)

Traits		Genotype					
		AA		AG_1		G_1G_1	
		$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n
Live mass, g	on day 7	201.77 ± 2.99	30	196.54 ± 2.69	54	187.57 ± 9.85	7
	on day 33	2083 ± 21	48	2079 ± 16	79	2046 ± 30	11
Puberty, days		199.67 ± 1.79	49	199.48 ± 1.41	79	181.46 ± 18.18	11
Egg mass, g	on day 210	60.32 ± 0.41	49	66.96 ± 7.02	79	61.76 ± 1.21	11
	on day 364	70.41 ± 0.88	34	70.49 ± 0.57	48	72.92 ± 2.81	5
Egg-laying ability	eggs/210 days	11.67 ± 1.15	33	9.71 ± 0.83	62	7.55 ± 1.53	9
	eggs/364 days	89.24 ± 3.04	49	83.38 ± 2.72	79	75.09 ± 6.70	11
Fertility rate, per cent		85.94 ± 2.30	49	89.28 ± 1.73	77	84.20 ± 5.97	10
Hatchability, per cent		83.50 ± 2.22	49	79.11 ± 2.06	75	83.18 ± 5.33	10

Table 3. Comparison of productive traits in chicken of Cornish breed cross “Smena-8” of different genotypes for the myostatin gene (*MST2244*-SNP)

Traits		Genotype					
		CC		CG_2		G_2G_2	
		$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n
Live mass, g	on day 7	179.5 ± 6.69 ^a	6	193.95 ± 3.12 ^c	42	203.52 ± 2.48 ^b	44
	on day 33	2018 ± 31 ^e	8	2073 ± 17	68	2090 ± 18 ^f	64
Puberty, days		174.13 ± 24.77	8	200.34 ± 1.48	68	199.03 ± 1.59	65
Egg mass, g	on day 210	60.44 ± 1.17	8	69.06 ± 8.12	68	59.51 ± 0.69	65
	on day 364	69.43 ± 2.83	3	70.69 ± 0.68	39	70.53 ± 0.71	46
Egg-laying ability	eggs/210 days	6.57 ± 1.76	7	9.31 ± 0.80	52	11.50 ± 1.06	46
	eggs/364 days	72.5 ± 9.01	8	82.54 ± 2.72	68	88.47 ± 2.86	65
Fertility rate, per cent		84.31 ± 7.74	7	88.92 ± 1.95	66	86.29 ± 1.99	65
Hatchability, per cent		83.29 ± 6.02	7	79.49 ± 2.35	64	81.61 ± 2.01	65

Statistical significance of means between groups: ^a and ^b, $p < 0,01$; ^c and ^b, $p < 0,05$; ^e and ^f, $p < 0,05$.

отбор на показатели мясной продуктивности, поэтому генотипы, имеющие низкие показатели живой массы, малочисленны.

Следует полагать, что отбор желаемых генотипов позволит повысить интенсивность размножения животных с лучшими качествами. Кроме того, молекулярная оценка генотипа дает возможность уверенно проводить селекционную работу для планирования структуры стада и повышения продуктивности кур. Исследование генотипа животных на определенном этапе значительно ускоряет генетический прогресс и увеличивает точность селекционной работы.

Acknowledgments

The authors are grateful to the RAS Corresponding Member L.I. Tuchemskiy and Cand. Sci. (Biol.) Zh.V. Emanuylova for information on the qualitative traits of the chicken flock under study.

This work was supported by the Program of Academic Research of State Academies of Sciences, 2013–2020.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Baron E.E., Wenceslau A.A., Alvares L.E., Nones K., Ruy D.C., Schmidt G.S., Zanella E.L., Coutinho L.L., Ledur M.C. High level of polymorphism in the myostatin chicken gene. Proc. 7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. Montpellier. 19–23 August, 2002.
- Dementeva N.V., Terletskiy V.P., Tyshchenko V.I., Yakovlev A.F. Use of DNA fingerprinting method for study of genetic divergence in populations of agricultural animals. Vestnik RASKhN=Herald of Russian Academy of Agricultural Science. 2003;1:79-80.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Ménéssier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. Mammal. Genome. 1998;9(3):210-213.
- Hu W., Chen S., Zhang R., Liu Y. Single nucleotide polymorphisms in the upstream regulatory region alter the expression of myostatin. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 2013;49(6):417-423. DOI 10.1007/s11626-013-9621-5
- Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L., Bass J.J. Mutations in myostatin (*GDF8*) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res. 1997;7(9):910-915.
- McCroskery S., Thomas M., Maxwell L., Sharma M., Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J. Cell. Biol. 2003;162(6):1135-1147.
- McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature. 1997;387(6628):83-90.
- McPherron A.C., Lee S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997;94(123):12457-12461.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 2000;275(51):40235-40243.
- Tyshchenko V.I., Dementeva N.V., Terletskiy V.P., Yakovlev A.F. Evaluation of genetic variability in chicken populations on the basis of genomic fingerprinting. Selskokhozyaystvennaya biologiya=Agri-cultural Biology. 2002;6:43-46.
- Yakovlev A.F., Terletskiy V.P., Sekste E.A., Tuchemskiy L.I., Emanuylova Zh.V. Impact of growth hormone gene on productive traits in chicken. Ptitsevodstvo=Poultry industry. 2013;1:2-4.
- Ye X., Brown S.R., Nones K., Coutinho L.L., Dekkers J.C., Lamont S.J. Associations of myostatin gene polymorphisms with performance and mortality traits in broiler chickens. Genet. Sel. Evol. 2007;39(1):73-89.
- Zhang G.X., Zhao X.H., Wang J.Y., Ding F.X., Zhang L. Effect of exon 1 mutation in the myostatin gene on the growth traits of the Bian chicken. Anim. Genet. 2012;43(4):458-459. DOI 10.1111/j.1365-2052.2011.02274.x
- Zhiliang G., Dahai Z., Ning L., Hui L., Xuemei D., Changxin W. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. Sci. China C. Life Sci. 2004;47(1):25-30.
- Zhivotovsky L.A. Populyatsionnaya biometriya [Populational Biometry]. Moscow, Nauka, 1991.

Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России

И.Г. Адонина¹, И.Н. Леонова¹, Е.Д. Бадаева², Е.А. Салина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Для характеристики геномов 20 сортов мягкой пшеницы, созданных в различных регионах России, были использованы молекулярно-генетический и молекулярно-цитологический подходы. Молекулярно-генетический анализ проводился с применением 29 SSR-маркеров, охватывающих весь геном, и 41 ISBP-маркера, локализованного на хромосоме 5B. Анализ генетического сходства, проведенный на основании результатов молекулярного генотипирования, показал, что озимые пшеницы образуют общий кластер независимо от происхождения и зоны возделывания. Это, в первую очередь, объясняется тем, что при создании озимых сортов для Западно-Сибирского региона привлекались формы, происходящие из европейской части России. Сравнительный анализ индивидуальных дендрограмм, построенных на основании данных по одному-двум маркерам на каждую хромосому и с привлечением большего числа маркеров по хромосоме 5B, позволяет, помимо оценки генетического разнообразия, идентифицировать сорта, имеющие перестройки по изучаемой хромосоме. Показана кластеризация озимой пшеницы Васса с яровым сортом Челябинска 75, что может быть косвенным подтверждением использования озимых форм в селекции для повышения потенциала продуктивности яровой пшеницы. В результате молекулярно-цитологического анализа методами C-бэндинга и FISH у 8 из 20 изученных сортов были выявлены различные хромосомные перестройки, в том числе интрогрессии, происходящие от *S. cereale*, *Ae. speltoides* и *Th. intermedium*. Таким образом, сочетание двух подходов позволило более полно охарактеризовать геномные особенности сортового материала мягкой пшеницы различного происхождения.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; озимые и яровые сорта; генотипирование; SSR- и ISBP-маркеры; C-бэндинг; флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions

I.G. Adonina¹, I.N. Leonova¹, E.D. Badaeva², E.A. Salina¹

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

² Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

We used molecular-genetic and molecular-cytology approaches to characterize the genomes of 20 varieties of wheat created in different regions of Russia. A molecular-genetic analysis was performed using 29 SSR-markers covering the entire genome, and 41 ISBP-markers localized on chromosome 5B. Analysis of genetic similarity based on the results of molecular genotyping showed that the winter wheat varieties form a common cluster, regardless of the origin or area of cultivation. This is primarily due to the fact that the varieties originating from the European part of Russia were used to establish winter wheat varieties for West Siberia. Comparative analysis of individual dendrograms constructed using 1–2 markers per chromosome, and with the involvement of a larger number of 5B-chromosome markers allowed us to identify varieties with rearrangements of this chromosome and to assess genetic diversity. We found that winter wheat Vassa and spring wheat Chelyaba 75 were clustered closely together. This is an indirect confirmation of the use of winter wheat varieties in the breeding to improve the productive potential of spring wheat. Molecular-cytology analysis by C-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) revealed various chromosomal rearrangements in 8 of 20 cultivars studied, including translocations from *S. cereale*, *Ae. speltoides* and *Th. intermedium*. Thus, a combination of the two approaches allowed us to better characterize genomes of wheat varieties of various origin.

Key words: *Triticum aestivum*; winter and spring varieties; genotyping; SSR- and ISBP-markers; C-banding; fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Адонина И.Г., Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):44-50. DOI 10.18699/VJ16.107

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Adonina I.G., Leonova I.N., Badaeva E.D., Salina E.A. Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1): 44-50. DOI 10.18699/VJ16.107

ORIGINAL ARTICLE

Received 16.07.2015 г.

Accepted for publication 17.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

Мягкая или хлебная пшеница (*Triticum aestivum* L.) относится к наиболее важным зерновым культурам. На территории России возделываются как озимая, так и яровая пшеница. Озимые сорта выращиваются преимущественно в Центрально-Черноземной зоне, на Северном Кавказе, в Среднем и Нижнем Поволжье, характеризующихся умеренными морозами и хорошим снежным покровом. Однако в последнее время озимая пшеница активно продвигается в Уральский и Сибирский регионы.

Задачи, направленные на создание сортов, сочетающих устойчивость к вредным биотическим и абиотическим факторам с высокой продуктивностью, остаются актуальными на протяжении многих лет. В последние годы в селекционной практике все активнее используют современные биотехнологические подходы. К числу наиболее важных методов относится генотипирование культивируемых сортов и линий с помощью молекулярных маркеров. Оно проводится для детальной характеристики геномов сортов и гибридов с целью выявления районов хромосом, содержащих селекционно-ценные гены; мониторинга селекционных процессов, охраны авторских прав и защиты продукции растениеводства от возможных фальсификаций. При генотипировании пшеницы и ее гибридов можно использовать два подхода: 1) молекулярно-генетический, связанный с изучением геномной ДНК; 2) молекулярно-цитологический, основанный на сравнительном анализе структуры хромосом.

В настоящее время спектр маркеров, используемых для молекулярно-генетического анализа, очень обширен. Один из наиболее известных типов – SSR-маркеры (Simple Sequences Repeats, синоним – микросателлитные маркеры), которые используются для оценки генетического разнообразия пшеницы в последние два десятилетия (Plaschke et al., 1995; Huang et al., 2002; Khlestkina et al., 2004; Salem, Mattar, 2014). Инструментом массового анализа линий и сортов пшеницы является также использование маркеров SNP (Single Nucleotide Polymorphism), выявляющих однонуклеотидный полиморфизм (Würschum et al., 2013; Bonman et al., 2015). Благодаря бурному развитию технологий геномного секвенирования относительно недавно появился новый тип маркеров – ISBP- (Insertion Site-Based Polymorphism) маркеры (Paux et al., 2010). Разработка ISBP-маркеров основана на уникальности встраивания мобильных элементов в геномную ДНК пшеницы, благодаря чему ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих точку инсерции мобильного элемента, дает специфичный продукт амплификации определенной длины (Paux et al., 2010).

Молекулярно-цитологический анализ представляет собой индивидуальное маркирование метафазных хромосом и чаще всего включает в себя С-дифференциальное окрашивание (С-бэндинг) и флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с различными зондами.

С-бэндинг позволяет идентифицировать все хромосомы мягкой пшеницы и многих ее сородичей (Gill et al., 1991; Friebe, Gill, 1996), а также выявлять транслокации и другие структурные хромосомные перестройки (Badaeva et al., 2007).

FISH органично дополняет С-бэндинг. Для идентификации индивидуальных хромосом мягкой пшеницы обычно используются пробы pSc119.2 и pAs1, которые позволяют идентифицировать 17 из 21 хромосомы (Schneider et al., 2003). По некоторым сайтам гибридизации с pSc119.2 и pAs1 наблюдается межсортовой полиморфизм (Schneider et al., 2003). На настоящий момент известна локализация проб pSc119.2 и pAs1 на хромосомах ряда других злаков. Кроме того, для идентификации хромосом пшеницы и чужеродных хромосом в геноме сортов и линий, полученных путем отдаленной гибридизации, были разработаны новые геном-специфичные зонды, такие как Spelt1 и Spelt52 (Salina et al., 2006a), Fat (Badaeva et al., 2010), pTa535 (Komuro et al., 2013).

Целью данной работы была оценка эффективности разных подходов и методов для генотипирования сортов и применения в селекционной практике.

Материалы и методы

Растительный материал

Для проведения сравнительного анализа геномного состава было отобрано 20 сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*, различающихся по типу развития (яровой/озимый), полученных и районированных в разных регионах России (таблица). В качестве стандарта при проведении молекулярно-генетического и молекулярно-цитологического анализа использовался сорт мягкой пшеницы Chinese Spring.

Выделение ДНК и SSR-анализ

Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). В работе были использованы SSR-маркеры Xgwm (Röder et al., 1998), Xtaglgap (Devos et al., 1995) с известной локализацией на хромосомах гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*. Список SSR-маркеров, использованных в данной работе, приведен в Доп. материалах 1¹. Процедура проведения полимеразной цепной реакции опубликована в работе Родер с коллегами (Röder et al., 1998). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ABI GeneScan (версия 2.1), разработанной компанией Applied Biosystems.

ISBP-анализ

В ISBP-анализ были взяты маркеры, разработанные по результатам частичного пиросеквенирования хромосомы 5В мягкой пшеницы (Sergeeva et al., 2014) с использованием программы IsbpFinder (Paux et al., 2010). Список маркеров и их характеристика приведены в Доп. материалах 2. Процедуру touchdown-ПЦР проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Paux et al., 2006). Полиморфизм между сортами проявлялся в наличии или отсутствии фрагмента ПЦР, который выявляли электрофорезом в 1%-м агарозном геле.

¹ Дополнительные материалы 1, 2 см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20/appx1.pdf>

Common wheat varieties studied

Variety	Growth habit	Originator	Chromosomal rearrangements*
Filatovka	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	Translocation 1RS.1BL
Biyskaya ozimaya	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 9	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 32	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 40	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 51	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Kulundinka	Winter	ICG SB RAS	–
Bagrationovskaya	Winter	ICG SB RAS	–
Fisht	Winter	Krasnodar Luk'yanenko RIA	Translocations 5BS.5GL and 6BS.6GL; chromosomal substitutions 1D/1Dt and 6D/6Dt
Vassa	Winter	Krasnodar Luk'yanenko RIA	Translocation 1RS.1BL
Tanya	Winter	Krasnodar Luk'yanenko RIA	Translocation 1RS.1BL
Chelyaba 75	Spring	RIA, Chelyabinsk	Translocation 2DS.2SL
Bezenchukskaya 98	Spring	RIA, Samara	Pericentric inversion of chromosome 2B
Tulaikovskaya 100	Spring	RIA, Samara	Chromosomal substitution 6Ai/6D
Omskaya 23	Spring	SRIA, Omsk	
Pamyati Vavenkova	Spring	SRIPIB	
Novosibirskaya 15	Spring	SRIPIB	Change of the C-banding pattern of 5B(L)
Novosibirskaya 29	Spring	SRIPIB	
Novosibirskaya 31	Spring	SRIPIB	
Novosibirskaya 44	Spring	SRIPIB	

* Identified by C-banding and FISH.

ICG SB RAS, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk; SRIPIB, Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding – филиал ИЦиГ СО РАН (Novosibirsk oblast, Krasnoobsk); SRIA, Siberian Research Institute of Agriculture, Omsk; RIA, Research Institute of Agriculture.

Кластерный анализ

Данные SSR- и ISBP-анализа были использованы для исследования генетического сходства сортов. При помощи пакета программ PHYLIP (Version 3.69) (Felsenstein, 2006) были определены генетические расстояния для каждой пары образцов по Нею (Nei, Li, 1979). Построение дендрограмм выполнено по методу UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sokal, Rohlf, 1995). Для оценки достоверности построенных деревьев проводили бутстреп (bootstrap) анализ для 100 повторностей с помощью программы SEQBOOT (Felsenstein, 2006).

С-дифференциальное окрашивание (С-бэндинг)

С-бэндинг проводили по ранее опубликованной методике (Badaeva et al., 1994). Препараты анализировали при помощи микроскопа Leitz Wetzlar. Для получения изображений использовали цифровую камеру CCD Leica DFC 280. Хромосомы классифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Badaeva et al., 1990; Gill et al., 1991).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina

et al., 2006a). Для идентификации хромосом использовали меченые с помощью реакции ник-трансляции пробы: pSc119.2 (мономер 120 п.н., повтор выделен из генома ржи) (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (мономер 336 п.н., повтор выделен из генома *Aegilops tauschii* Coss.) (Rayburn, Gill, 1986). Дополнительно была проведена геномная *in situ* гибридизация (GISH) с ДНК ржи (*Secale cereale* L.) и пырея (*Thinopyrum intermedium* (Host) = *Agropyron intermedium* (Host)) и гибридизация с зондом Spelt1 (мономер 178 п.н.), повтор выделен из генома *Aegilops speltoides* Tausch. (Salina et al., 2004).

Зонды метили биотином или дигоксигенином. Детекция биотинилированных зондов осуществлялась с помощью авидина, конъюгированного с флуоресцеином (Fluorescein Avidin D, Vector Laboratories, США) (<http://vectorlabs.com>). Сигнал гибридизации усиливался с применением флуоресцеин анти-авидина (Fluorescein Anti-Avidin D, Vector Laboratories, США) (<http://vectorlabs.com>). Зонды, меченные дигоксигенином, выявляли с помощью антител к дигоксигенину, конъюгированных с родамином (Antidigoxigenin-rhodamine, Fab fragments, Sigma-Aldrich, США) (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Препараты заключали в среду, замедляющую выцветание флуоресценции (Vectashield mounting medium, Vector

Laboratories, США) (<http://vectorlabs.com>), содержащую 0,5 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, США) (<http://www.sigmaaldrich.com>), для окрашивания хромосом и анализировали с помощью микроскопа «Аxioskop» 2 Plus (Zeiss, Германия). Изображение регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO).

Работа выполнена на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Результаты

Молекулярно-генетический анализ

SSR-анализ с использованием 29 маркеров, охватывающих все хромосомы мягкой пшеницы (см. Доп. материала 1), выявил у изучаемых сортов 162 аллеля.

В отличие от SSR-маркеров, для каждого из которых обнаружено от двух (маркеры Xgwm192c, 192b, 1154) до 10 (маркер Xgwm619) аллелей, полиморфизм по ISBP-маркеру заключается только в наличии или отсутствии конкретного фрагмента амплификации. В ISBP-анализ был взят 41 маркер (см. Доп. материалы 2), разработанный для хромосомы 5В мягкой пшеницы (11 для короткого плеча и 30 для длинного). По результатам молекулярно-генетического анализа были построены дендрограммы, отражающие генетическое сходство сортов (рис. 1, а, б). Одна дендрограмма построена на основании данных только SSR-анализа (рис. 1, а), вторая – с учетом суммарных результатов SSR- и ISBP-анализов (рис. 1, б). Сравнительный анализ дендрограмм выявил общие закономерности. В обоих случаях сорта объединяются в крупные кластеры, к одному из которых относятся озимые пшеницы независимо от их происхождения, к другим – яровые. Яровые сорта в свою очередь делятся на два основных кластера. В одном из них представлены сорта главным образом новосибирской селекции, а другой объединил в себе остальные яровые пшеницы. При этом, по данным SSR- и ISBP-анализов, наблюдаются различия по сортам, входящим в субкластеры, что, видимо, отражает различный уровень дивергенции сортов по отдельным хромосомам в районах локализации маркеров. Контрольный сорт Chinese Spring отделяется от остальных сортов на обеих дендрограммах. На дендрограмме, построенной с учетом результатов SSR- и ISBP-анализов (рис. 1, б), сорт Фишт также образует отдельную ветвь.

Цитогенетический анализ

Проведено индивидуальное маркирование метафазных хромосом 20 сортов мягкой пшеницы методами С-бэндинга и *in situ* гибридизации с зондами pSc119.2 и pAs1. Дополнительно были проведены геномная *in situ* гибридизация с ДНК ржи и пырея и гибридизация с зондом Spelt1. Хромосомные перестройки выявлены у восьми из 20 изученных сортов (рис. 2).

Транслокация 1RS.1BL от ржи выявлена у сортов Филатовка, Тая и Васса (рис. 2, а). Челябинка 75 имеет транслокацию 2DS.2SL от *Ae. speltoides* (рис. 2, е). Тулайковская 100 несет хромосому пырея (хромосомное замещение 6Ai/6D) (рис. 2, ж). Наибольшее число хромосомных перестроек выявлено у сорта Фишт, это транслокации 5BS.5GL (рис. 2, в) и 6BS.6GL (рис. 2, з), хромосомные замещения

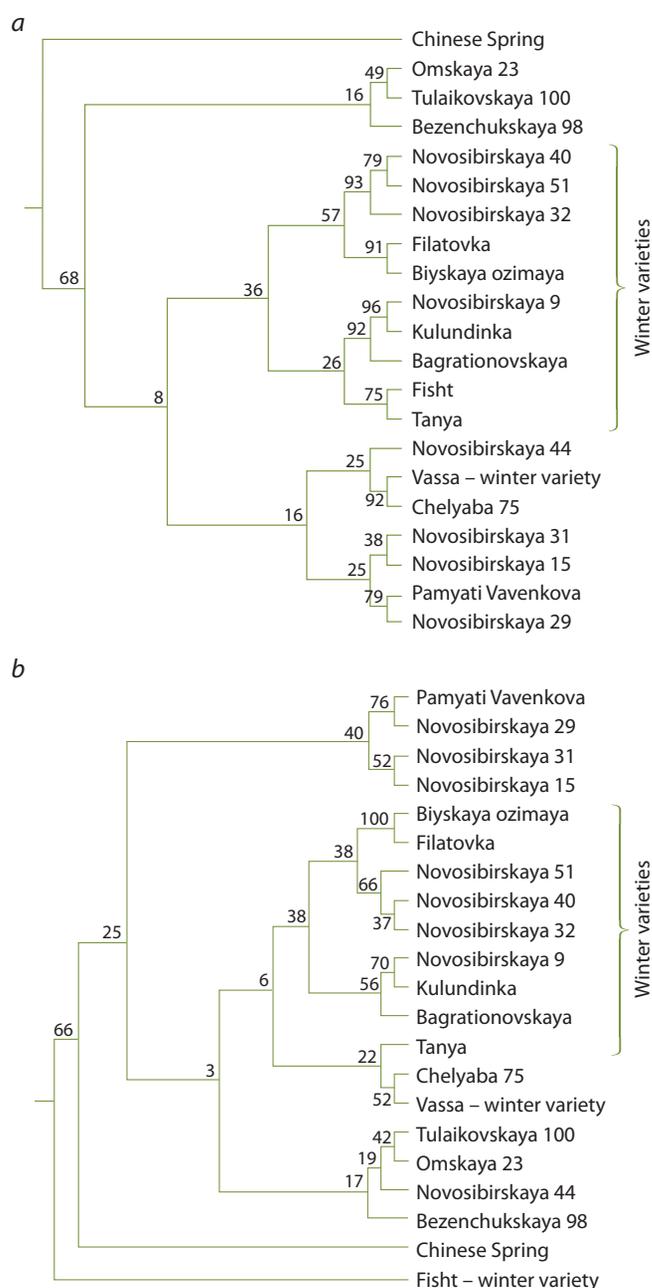


Fig. 1. Dendrogram illustrating the genetic similarity between varieties of wheat according to the data of (a) SSR marker analysis and (b) SSR and ISBP marker analysis.

Bootstrap values are displayed above the branches.

1D/1Dt (рис. 2, д), 6D/6Dt (рис. 2, ж). В сорте Безенчукская 98 идентифицирована периферическая инверсия хромосомы 2В (рис. 2, б), а для сорта Новосибирская 15 выявлены изменения расположения С-бэндов на длинном плече хромосомы 5В (рис. 2, в).

Обсуждение

Анализ родословных 91 сорта яровой мягкой пшеницы, перечисленных в «Каталоге районированных сортов сельскохозяйственных культур в Российской Федерации» (1992), показывает, что на долю сортов, созданных на

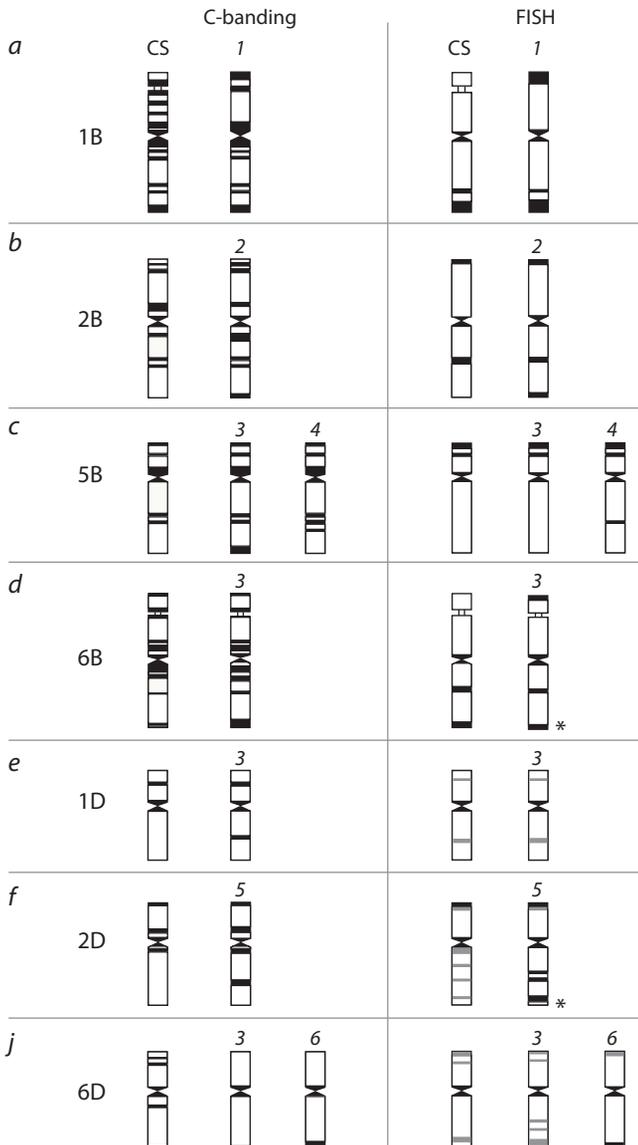


Fig. 2. Caryogram illustrating chromosomal rearrangements identified by C-banding and FISH in common wheat varieties used in the present study.

CS, Chinese Spring; 1, Filatovka, Tanya, Vassa; 2, Bezenchuskaya 98; 3, Fisht; 4, Novosibirskaya 15; 5, Chelyaba 75; 6, Tulaikovskaya 100. Black bands indicate sites of hybridization with the pSc119.2 probe; gray bands, with the pAs1 probe in the FISH section. Hybridization sites with the Spelt1 probe are indicated with asterisks.

основе гибридизации, приходится 95,6 % (Зыкин, 2001). Таким образом, основным методом создания сортов является рекомбинационная селекция, в основе которой лежит гибридизация с последующим отбором. По теории селекции родительские формы, выбираемые для скрещивания, должны отвечать следующим основным требованиям: 1) отдаленность по эколого-географическому происхождению; 2) генетическая разнокачественность; 3) комбинационная способность, т. е. успешность в передаче положительных свойств потомкам; 4) являться носителями тех или иных признаков и свойств (Шаманин, 2006). Кроме того, поскольку ограниченное число исходных форм сузило генетическое разнообразие мягкой пшеницы, в настоящее время для его увеличения и в качестве

источников эффективных генов устойчивости к патогенам используются сородичи пшеницы – дикие и культурные виды злаков. Одними из наиболее удачных и используемых в селекции являются транслокации короткого плеча хромосомы 1R ржи в хромосому 1A либо 1B пшеницы (Lukaszewski, 1990). Довольно интенсивно в гибридизацию вовлекаются различные виды пырея (Синниговцев, 1976; Sibikeev et al., 1995; Friebe et al., 1996). Достаточно часто в качестве доноров полезных генов выступают виды рода *Aegilops* (Friebe et al., 1996; Schneider et al., 2008).

В подборе родительских форм, контроле селекционного процесса и качества сортового материала значительную помощь селекционерам может оказать молекулярная генетика с ее обширным арсеналом маркеров.

Для генетической паспортизации сортов пшеницы, а также характеристики межсортовых замещений и рекомбинации генетического материала мягкой пшеницы наиболее подходящими являются маркеры индивидуальных локусов, картированные на хромосомах. В настоящий момент для анализа генома пшеницы часто используют SSR-, ISBP- и SNP-маркеры (Paux et al., 2012). SSR-маркеры отличает большое число аллелей в одном локусе, в то время как ISBP и SNP являются биаллельными. Они также различаются по частоте встречаемости в геноме: один SSR-маркер на 10 000 п. н.; один ISBP на 5 400 п. н.; один SNP на 99 п. н. (Paux et al., 2012).

В нашей работе для генотипирования сортов мягкой пшеницы, созданных в различных регионах России, использовали как мультиаллельные SSR-, так и биаллельные ISBP-маркеры. SSR-маркеры охватывают весь геном, при этом на каждую хромосому приходится один-два маркера (см. Доп. материалы 1). ISBP-маркеры локализованы на одной хромосоме 5B, их число достигает 41 (см. Доп. материалы 2). Сравнительный анализ дендрограмм, построенных с близким числом маркеров на каждую хромосому (см. рис. 1, а) и с привлечением дополнительно более обширного числа маркеров по одной из хромосом (см. рис. 1, б), показал, что увеличение числа маркеров позволяет помимо оценки генетического разнообразия сортов в целом идентифицировать сорта с перестройками по изучаемой хромосоме. Так, на дендрограмме, построенной по данным SSR-анализа (см. рис. 1, а), сорт Фишт лежит внутри кластера озимых сортов, а на второй дендрограмме (см. рис. 1, б) он выделяется в обособленный кластер. Это объясняется тем, что данный сорт несет транслокацию 5BS.5GL от *Triticum miguschovae* [*Triticum militinae* (A¹A¹GG) × *Aegilops tauschii* (DD)] Zhir (Davoyan, et al., 2015) (рис. 2, в), что выявляется при расширении числа маркеров на данную хромосому.

По результатам анализа генетического сходства, проведенного с помощью как SSR-, так и SSR-маркеров совместно с ISBP-маркерами, озимые пшеницы образуют общий большой кластер независимо от места получения сорта. Это, по-видимому, связано с тем, что в селекции озимой пшеницы в Сибири использовались сорта из европейской части России. Так, например, Краснодарская 39 присутствует в родословных таких сибирских сортов, как Филатовка, Новосибирская 40 и Новосибирская 51. Новосибирская 32 получена от озимой пшеницы Аврора (краснодарская селекция). При создании Бийской озимой про-

водилось скрещивание с известнейшим кубанским сортом Безостая 1. Только в одном случае озимый сорт (Васса) кластеризуется вместе с яровым (Челяба 75). При этом, как показано на рис. 1, б, они попадают в общий кластер озимых сортов, на рис. 1, а они оказываются в кластере яровых сортов новосибирской селекции. Объяснением этому может служить тот факт, что один из принципов подбора пар для скрещивания основан на эколого-географических различиях между родителями с целью объединения положительных признаков разных экотипов в новом сорте (Шаманин, 2006). Одним из примеров успешного применения описываемого принципа подбора пар для скрещиваний является использование озимых форм для повышения потенциала продуктивности яровой пшеницы (Рутц, 2004).

Другой подход, использованный нами для характеристики сортов, молекулярно-цитологический, связан со сравнительным анализом структуры хромосом. Следует особо подчеркнуть, что методы хромосомного маркирования позволяют преодолеть трудности, возникающие при использовании молекулярно-генетических маркеров, выявляемых на основе ПЦР и секвенирования. Прежде всего, использование молекулярно-цитологических маркеров (методы дифференциального окрашивания, гибридизация *in situ*) позволяет эффективно выявлять различные хромосомные перестройки, такие как внутригеномные транслокации, инверсии, образование изохромосом и моносомиков, делеции и т.д. Чужеродные интрогрессии также успешно определяются методами GISH, FISH и дифференциального окрашивания. Низкая эффективность идентификации чужеродных интрогрессий с помощью молекулярно-генетических маркеров объясняется тем, что маркеры разрабатываются обычно для генома мягкой пшеницы, и их присутствие в геноме дикорастущих видов злаков снижается на 50–99 % (Salina et al., 2006b).

Молекулярно-цитологический анализ изученных нами сортов пшеницы выявил иные их особенности, нежели молекулярно-генетический анализ. Так, например, сорта Васса и Челябинка 75 на обеих дендрограммах, построенных по данным молекулярно-генетического анализа, кластеризуются вместе, причем с достаточно высокими значениями бутстрепа, в то время как молекулярно-цитологический анализ показал значительные различия между этими сортами. Сорт Челябинка 75 создан при использовании линий с комплексной устойчивостью, полученных в ВИР с участием *Ae. speltoides* (Одинцова и др., 1991); по данным проведенного нами исследования, он несет транслокацию 2DS.2SL от *Aegilops* (рис. 2, е). У сорта Васса выявлена пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL (рис. 2, а). У сортов Филатовка и Тяня также обнаружена транслокация 1RS.1BL, что никак не сказывается на их местоположении на дендрограммах. С другой стороны, сорт Бийская озимая, не несущая транслокации 1RS.1BL, на обеих дендрограммах кластеризуется вместе с сортом Филатовка с очень высоким значением бутстрепа. Сорта Тулайковская 100 и Омская 23 также группируются вместе, несмотря на присутствие в геноме сорта Тулайковская 100 целой чужеродной хромосомы (6A1 от пырея), заместившей хромосому 6D (Salina et al., 2015). Даже сорт Фишт, характеризующийся множественными транслокациями от *T. miguschovae*, по результатам микро-

сателлитного анализа, объединяется с высоким значением бутстрепа с сортом Тяня, у которого не обнаружено никаких значительных хромосомных перестроек, кроме транслокации 1RS.1BL.

Молекулярно-цитологический анализ позволяет в ряде случаев выявлять неоднородность сортов. Так, транслокация 1RS.1BL от ржи присутствовала не у всех растений сортов Тяня и Филатовка. Причем родословная сорта Филатовка напрямую не включает источник ржаного хроматина, следовательно, обнаружение транслокации 1RS.1BL у отдельных растений данного сорта может являться результатом случайной спонтанной гибридизации. Следует отметить, что при проведении молекулярно-цитологического анализа именно сочетание двух подходов, С-бэндинга и FISH, позволило получить наиболее четкое представление о структурных хромосомных перестройках, имевших место при создании того или иного сорта. Так, например, перичентрическая инверсия хромосомы 2B у сорта Безенчукская 98 (рис. 2, б), транслокации 5BS.5GL (рис. 2, в), 6BS.6GL (рис. 2, з) и хромосомное замещение 1D/1Dt (рис. 2, д) у сорта Фишт определяются только методом С-дифференциального окрашивания. С другой стороны, выявляемое FISH присутствие блока повтора Spelt1 на длинном плече транслоцированной хромосомы 6BS.6GL у сорта Фишт свидетельствует о неполном замещении длинного плеча хромосомы 6B на плечо хромосомы 6G, поскольку ни у одного из исследованных до настоящего времени образцов пшениц группы Timopheevi сайты гибридизации со Spelt1 на длинном плече 6G-хромосомы не обнаружены, зато такие сайты имеются у некоторых сортов мягкой пшеницы (Salina et al., 2006a).

Таким образом, благодаря сочетанию двух подходов мы смогли получить более полную характеристику особенностей генотипов мягкой пшеницы разного происхождения. Молекулярно-цитологический анализ выявил различные хромосомные перестройки, а также чужеродные интрогрессии; молекулярно-генетический анализ позволил оценить сходство генетического материала мягкой пшеницы в представленных сортах.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. M. Röder (IPK, Gatersleben, Germany), who generously provided us the SSR primers. They also acknowledge Dr. Bildanova's help in choosing ISBP-markers.

The study was done as part of the State Budgeted Program, project 0324-2015-0005, and supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-00297.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192:117-145. DOI 10.1007/BF00985912
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskiy V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome.* 2007;50:907-926. DOI 10.1139/G07-072
- Badaeva E.D., Zoshchuk S.A., Paux E., Gay G., Zoshchuk N.V., Röger D., Zelenin A.V., Bernard M., Feuillet C. Fat element – a new

- marker for chromosome and genome analysis in the Triticeae. Chromosome Res. 2010;18:697-709. DOI 10.1007/s10577-010-9151-x
- Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2
- Bonman J.M., Babiker E.M., Cuesta-Marcos A., Esvelt-Klos K., Brown-Guedira G., Chao S., See D., Chen J., Akhunov E., Zhang J., Bockelman H.E., Gordon T.S. Genetic diversity among wheat accessions from the USDA National Small Grains Collection. Crop Sci. 2015;55(3):1243-1253. DOI 10.2135/cropsci2014.09.0621
- Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Bespalova L.A., Puzirnyaya O.Y. Use of the synthetic form *Triticum miguschovae* for common wheat improvement. Proc. of the 3rd Intern. Conf. «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology». PlantGen 2015. Novosibirsk, 17-21 June. 2015.
- Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Gale M.D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. Theor. Appl. Genet. 1995;90:247-252.
- Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.66). 2006. Available from: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Friebe B., Gill B.S. Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploid wheats. Methods in Genome analysis in Plants. Boca Raton: CRC Press, 1996:39–60.
- Friebe B., Yang J., Raupp W.J., McIntosh A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). Genome. 1991;34:830-839. DOI 10.1139/g91-128
- Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganal M.W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 2002;105:699-707. DOI 10.1007/s00122-002-0959-4
- Katalog rayonirovannykh sortov selskokhozyaystvennykh kultur v Rossiyskoy Federatsii. T. 1. [Catalog of zoned varieties agricultural crops in the Russian Federation. V.1. Moscow, Russian State Commission for variety testing of agricultural crops under the Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 1992.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Efremova T.T., Börner A., Shumny V.K. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. Plant Breed. 2004;123:122-127. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00934.x
- Komuro S., Endo R., Shikata K., Kato A. Genomic and chromosomal distribution patterns of wheat with resistance to leaf rust revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure. Genome. 2013;56:131-137. DOI 10.1139/gen-2013-0003
- Lukaszewski A.J. Frequency of IRS.1AL and IRS.1BL translocations in United States wheats. Crop Sci. 1990;30:1151-1153. DOI 10.2135/cropsci1990.0011183X003000050041x
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979; 76:5269-5273.
- Odintsova I.G., Agafonova N.A., Boguslavskiy R.L. Introgressivnyye linii myagkoy pshenitsy s ustoychivostyu k buroy rzhavchine, peredannyi ot *Aegilops speltoides*. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii [Introgression lines of wheat with resistance to leaf rust transferred from *Aegilops speltoides*. Bulletin of Applied Botany, of Genetics and Plant Breeding]. Leningrad, VIR, 1991;142:106-110.
- Paux E., Faure S., Choulet F., Röger D., Gauthier V., Martinant J.P., Sourdille P., Balfourier F., Le Paslier M-C., Chauveau A., Cakir M., Gandon B., Feuillet C. Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. Plant Biotechnol. 2010;8:196-210. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00477.x
- Paux E., Röger D., Badavaeva E., Gay G., Bernard M., Sourdille P., Feuillet C. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. Plant J. 2006;48:463-474. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02891.x
- Paux E., Sourdille P., Mackay I., Feuillet C. Sequence-based marker development in wheat: Advances and applications to breeding. Biotechnol. Adv. 2012;30:1071-1088. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.09.015
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995;91:1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. Plant. Mol. Biol. Rep. 1986;4:102-109. DOI 10.1007/BF02732107
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. Genetics. 1998; 149:2007-2023.
- Rutic R.I. Istoriya razvitiya selektsionnoy raboty i sorta selskokhozyaystvennykh kultur Sibirskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta selskogo khozyaystva [The history of breeding and crop varieties of the Siberian Research Institute of Agriculture]. Novosibirsk, Jupiter, 2004.
- Salem Kh.F.M., Mattar M.Z. Genetic diversity in old and modern Egyptian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties revealed by simple sequence repeats Egypt. J. Genet. Cytol. 2014;43:143-156.
- Salina E.A., Adonina I.G., Badavaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. Euphytica. 2015;204(1):91-101. DOI 10.1007/s10681-014-1344-5
- Salina E., Adonina I., Vatolina T., Kurata N. A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch and related species. Genetica. 2004;122:227-237. DOI 10.1007/s10709-004-5602-7
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. Funct. Integr. Genomics. 2006b;6:71-80. DOI 10.1007/s10142-005-0001-4
- Salina E.A., Lim Y.K., Badavaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. Genome. 2006a;49:1023-1035. DOI 10.1139/G06-050
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. Plant Breeding. 2003;122:396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x
- Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilisation of *Aegilops* (goat-grass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. Euphytica. 2008;163:1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y
- Sergeeva E.M., Afonnikov D.A., Koltunova M.K., Gusev V.D., Miroshnichenko L.A., Vrána J., Kubaláková M., Poncet C., Sourdille P., Feuillet C., Doležel J., Salina E.A. Common wheat chromosome 5B composition analysis using low-coverage 454 sequencing the plant genome. Plant Genome. 2014;7(2):1-16. DOI 10.3835/10.0031
- Shamanin V.P. Obschchaya selektsiya i sortovedenie polevykh kul'tur: uchebnoe posobie [General selection and creation of varieties of field crops: a manual]. Omsk: Omsk State Agrarian University Publ., 2006.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Krupnov V.A. Genetic control for resistance to leaf rust in wheat-*Agropyron* lines: Agro 139 and Agro 58. Theor. Appl. Genet. 1995;90(5):618-620. DOI 10.1007/BF00222124
- Sinigovec M.E. Transfer of resistance to rust from wheat grass to the wheat by the addition and replacement of chromosomes. Genetika=Genetics (Moscow). 1976;12(9):13-20.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. Ed. W.H. Freeman. N.Y., 1995.
- Würschum T., Langer S.M., Longin C.F.H., Korzun V., Akhunov E., Ebmeyer E., Schachschneider R., Schacht J., Kazman E., Reif J.C. Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers. Theor. Appl. Genet. 2013;126:1477-1486. DOI 10.1007/s00122-013-2065-1
- Zikin V.A. Gibrizatsiya – osnova rekombinatsionnoy selektsii rasteniy: metod. rekomendatsii [Hybridization – the Basis of Recombination Breeding of Plants: Method. Recommendations]. Ufa, BNIISKH Publ., 2001.

Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

М.Н. Шаптуренко¹, Т.В. Печковская¹, С.И. Вакула¹, А.В. Якимович², Ю.М. Забара², Л.В. Хотылева¹

¹ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

² Республиканское унитарное предприятие «Институт овощеводства», Минская область, Минский район, пос. Самохваловичи, Беларусь

Капуста белокочанная как перекрестноопыляющаяся культура характеризуется высоким уровнем внутривидовой гетерогенности, что обуславливает трудности при создании генетически однородного материала и поддержании его чистоты. Одним из наиболее эффективных инструментов оценки генетического полиморфизма являются микросателлиты, которые относятся к высокополиморфным маркерам растительных геномов. Среди них наибольший интерес представляют EST-SSR, которые непосредственно связаны с экспрессирующимися областями и широко используются для анализа генетического разнообразия и структуры популяций. В связи с этим было проведено изучение эффективности использования трансферабельных EST-SSR-маркеров для межсортовой дифференциации и типирования индивидуальных растений *B. oleracea* var. *capitata*. В результате дана характеристика информативности 15 микросателлитных локусов. Определены эффективные мультиаллельные маркеры Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc, BoPC15 с высоким уровнем информационного содержания (PIC > 0,7), которые могут успешно использоваться для анализа меж- и внутрисортного полиморфизма *B. oleracea* var. *capitata*, включая типирование индивидуальных растений. На основе оценки аллельного состава SSR-локусов установлена генетическая структура селекционной коллекции капусты белокочанной и показано, что большинство экспериментальных форм, несмотря на различное происхождение, имеют общую предковую генетическую основу. Определены доноры редких аллелей, которые могут служить источником ценных генетических сегрегаций для селекционного улучшения капусты белокочанной. Показано, что межсортовой полиморфизм, выраженный в аллельном разнообразии изученных SSR-локусов, в значительной мере облегчает сортовую идентификацию и типирование индивидуальных растений при селекции. Полученная информация является основой для селекционного отбора генетически выровненного материала, а также дивергентных комбинаций скрещивания при селекции на гетерозис.

Ключевые слова: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; EST-SSR-маркеры; генетический полиморфизм.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шаптуренко М.Н., Печковская Т.В., Вакула С.И., Якимович А.В., Забара Ю.М., Хотылева Л.В. Информативные EST-SSR-маркеры для типирования и внутривидовой дифференциации *Brassica oleracea* var. *capitata* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):51-56. DOI 10.18699/VJ16.133

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shapturenko M.N., Pechkovskaya T.V., Vakula S.I., Jakimovich A.V., Zabara Yu.M., Khotyleva L.V. Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):51-56. DOI 10.18699/VJ16.133

ORIGINAL ARTICLE

Received 10.07.2015 г.

Accepted for publication 17.11.2015 г.

© AUTHORS, 2016

✉ e-mail: m.shapturenko@igc.by

Informative EST-SSR markers for genotyping and intraspecific differentiation of *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

M.N. Shapturenko¹, T.V. Pechkovskaya¹, S.I. Vakula¹, A.V. Jakimovich², Yu.M. Zabara², L.V. Khotyleva¹

¹ Institute of Genetics and Cytology of NAS, Minsk, Belarus

² Institute of Vegetable Growing, Minsk oblast, Minsk region, Samokhvalovichy, Belarus

Brassica oleracea var. *capitata* L. is characterized by a high level of intraspecific heterogeneity due to some biological features that cause difficulties or breeding creating genetically homogenous forms and maintaining their genetic purity. Microsatellites (SSR) are highly polymorphic markers of plant genomes and represent one of the most effective tools for assessing genetic polymorphism. Among microsatellites, EST-SSR are most interesting, because they are directly linked to the expressed sequences and for that reason are widely used for analysis of genetic diversity and population structure. In this work, we studied the effectiveness of the use of transferable EST-SSR markers for both analyzing white cabbage diversity and genotyping pure lines. As a result, 15 microsatellite loci were characterized for the information content, allelic frequencies and heterogeneity levels. The effective multiallelic markers (Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34, BoPLD1, BoCalc, BoPC15) with high information content (PIC > 0.7) that could be successfully used for analysis of inter- and intravarietal polymorphism in *B. oleracea* var. *capitata* were identified. It has been shown that intervarietal polymorphism expressed as the allelic diversity of EST-SSR loci greatly facilitates varietal identification and typing of individual plants for breeding purposes. Based on the SSR-evaluation and subsequent clustering, the genetic structure of the breeding collection was identified, which showed that most experimental forms, in spite of different origin, have a common ancestral genetic basis. The identified donors of rare alleles could potentially be a source of valuable genetic segregation for further *B. oleracea* breeding improvement.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; EST-SSR markers; genetic polymorphisms.

Капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *alba* DC; CC, $2n = 2x = 18$) является одной из наиболее важных овощных культур, благодаря широкой адаптационной способности, высокой урожайности и питательной ценности. Коммерческое производство капусты белокочанной ориентировано на выращивание гибридов F₁, что позволяет получить максимальный экономический эффект за счет феномена гетерозиса (Fang et al., 2005). Селекция гибридов F₁ базируется на использовании физиологической самонесовместимости и MS (male-sterile) систем и предполагает наличие генетически выровненного (линейного) исходного материала. Тем не менее, ввиду высокой внутривидовой гетерогенности, связанной с биологическими особенностями этой культуры, существует проблема создания генетически однородного материала и поддержания его чистоты (типичности) (Liwang et al., 2007; Ye et al., 2013).

Традиционная оценка селекционных форм, основанная на данных полевого испытания, позволяет отобрать образцы, выровненные по срокам созревания, размеру и форме кочана. Тем не менее генетическая компонента изменчивости, обусловленная гетерозиготностью особей по разным аллелям, как правило, остается за пределами такой оценки. Следовательно, возможности семейственного отбора так же, как и контроль типичности наследуемого в поколениях генетического материала, в значительной мере ограничены.

Доступные к настоящему времени методические подходы к анализу варибельности ДНК способны облегчить создание генетически однородных форм за счет отбора индивидуальных растений с установленным профилем амплифицированных ДНК фрагментов, а также обеспечить подбор дивергентных пар скрещивания перспективной межлинейной комбинации при селекции на гетерозис.

Удобным и технологичным методом ДНК-скрининга является микросателлитный (Simple Sequence Repeat, SSR) анализ, который эффективно используется для картирования, выявления сцепления и закономерностей наследования. Микросателлиты относятся к tandemно повторяющимся последовательностям ДНК, которые широко представлены в геноме растений и животных, включая кодирующие и некодирующие области (Zhang et al., 2004; Senan et al., 2014). У растений SSR-последовательности предпочтительно связаны с нетранслируемыми областями транскрибируемых регионов (Morgante et al., 2002). До недавнего времени микросателлиты рассматривались как «мусор» (т.е. элементы, не несущие существенной генетической информации), возникающий в результате ошибок репликации (Bhargava, Fuentes, 2010). С развитием геномики накоплено достаточно доказательств, подтверждающих генетические и фенотипические эффекты tandemных повторов, которые проявляют различные свойства в геномных областях с разной функциональностью (Katti et al., 2001; Kapil et al., 2014).

Микросателлитные маркеры выявляют большое разнообразие аллелей для отдельного локуса, поскольку события, обуславливающие вариацию в количестве повторов, являются частыми и обратимыми (Kashi, King, 2006). В некоторых случаях отмечается существование более

10 аллелей для одного маркера (Reif et al., 2006). Эта информация может быть полезна, так как обеспечивает эффективный способ отслеживания аллелей в популяции и позволяет дифференцировать генотипы при использовании относительно небольшого числа маркеров.

В настоящем исследовании проведено изучение генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокочанной и оценена эффективность использования микросателлитных (SSR) маркеров для анализа генетического полиморфизма и типирования *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

Материалы и методы

Объектом исследования служила селекционная коллекция образцов капусты белокочанной, полученных на основе коммерческих сортов различного эколого-географического происхождения: Альфредо (Alf) и Ротонда (Rot) голландской селекции; Арктика (Ark) и Семко юбилейный (Sem) российской селекции; Гранда (Gran), Роксана (Rok), Сулейка (Sul), Увертюра (Uver) и Халиф (Khal) а также линии L251, L264, L407, L573, L574, L575, L576, L577, L578, L580, L583, L661, L728, L783, L860, L962 немецкой селекции; линии Gr, Pl9 белорусской селекции.

ДНК выделяли из этиолированных проростков в трехкратной повторности при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (#K0512, Fermentas) согласно инструкции. Каждая повторность представлена материалом, полученным из 3–9 растений. Препараты ДНК разводили до конечной концентрации 10 нг/мл⁻¹ в деионизированной воде и хранили при температуре +4 °С.

Для оценки аллельного состава микросателлитных локусов использовали маркеры, разработанные на основе экспрессирующихся последовательностей (Expressed Sequence Tag, EST) (Tonguc, Griffiths, 2004; Louarn et al., 2007) для межвидовой дифференциации представителей рода *Brassica*. Амплификацию проводили на оборудовании «Biometra» (Германия) в стандартном режиме. Рассматривали возможность применимости и эффективности использования (трансферабельности) отобранных маркеров для дифференциации *B. oleracea* var. *capitata* L.

Анализ флюоресцентно меченых SSR-фрагментов выполнен на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США). Размер продуктов амплификации определяли с применением стандарта молекулярного веса S450 (Синтол, Россия). Полученные данные анализировали при помощи пакета прикладных программ GeneMapper 4.1.

Оценку аллельного состава SSR-локусов осуществляли на основе бинарных матриц. Расчет генетических расстояний и кластеризацию экспериментального материала методом UPGMA выполняли с использованием программы DARwin 5.0 (vers. 1.3b). Генетическую структуру определяли при помощи анализа главных компонент (PCA). Оптимизацию иерархической структуры коллекции проводили путем подсчета ΔK (где K – число групп высшей иерархии) в программе Structure 2.3.4. (Pritchard et al., 2009). Анализ частот SSR-локусов и информационного содержания соответствующих маркеров выполнен при помощи приложения GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012).

Результаты

Аллельный состав и генетическая вариация SSR-локусов

При изучении генетического разнообразия селекционной коллекции капусты белокачанной, представленной 27 образцами различного происхождения, использовали 15 пар микросателлитных маркеров. В результате ДНК-типирования рассмотрено 86 аллелей в 15 SSR-локусах. Уровень наблюдаемого полиморфизма составил 97,9 %. Фактический размер фрагментов варьировал по отношению к теоретически ожидаемому, за небольшим исключением. Количество рассмотренных аллелей на locus достигало 2–11, и в среднем составило 5,7 на один locus. Также отмечено значительное варьирование частот SSR-аллелей (рис. 1, таблица). Наблюдаемые частоты минорных аллелей (MAF – Minor Alleles Frequencies) были сдвинуты к $MAF < 0,32$ (рис. 1, б).

На долю редких ($MAF < 0,05$) пришлось около 14,9 % от общего числа аллелей, которые были выявлены в локусах: *BoDCTD8* (174 п. н.), *BoIAB15TF* (218, 240, 293 п. н.), *BoIAB20TR* (204 п. н.), *BoTHL1* (140 п. н.), *PLD2* (243, 247, 254 п. н.), *REM1b* (172 п. н.), *BoPLD1* (302 п. н.), *BoAB11* (169 п. н.), *BoCalc* (140 п. н.), *PC15* (159 п. н.). Тогда как наиболее распространенные ($MAF > 0,5$) составили 26,9 %. Размер фрагментов *BoDel9* (262 п. н.), *BoIAB15TF* (302 п. н.), *BoIAB20TR* (197, 314 п. н.), *BoCalc* (242 п. н.), *BoTHL1* (149 п. н.), *BoPLD2* (188 п. н.), *Rem1b* (163 п. н.) соответствовал теоретически ожидаемому. Частоты преобладающих аллелей ($MAF > 0,5$) в значительной степени варьировали между локусами с различным уровнем полиморфизма. Так, например, аллель 1401 п. н. локуса *BoCalc*, выявляющего восемь различных аллельных вариантов, имеет частоту 0,037, тогда как аллель 188 п. н. наименее варибельного локуса *BoPLD2* представлен с частотой 0,98.

Индекс информативности (PIC) анализируемых SSR-локусов ранжировался от 0,193 (для *BoIAB15TF*) до 0,866 (для *BoIAB20TR*) и в среднем достигал 0,64 (таблица). Уровень гетерогенности варьировал от 0,071 до 0,436 и имел среднее значение $0,276 \pm 0,016$, подтверждая существование полиморфизма во всех исследуемых SSR-локусах. Наиболее информативными ($PIC > 0,7$) оказались локусы *BoDCTD1*, *BoIAB20TR*, *BoPC34*, *BoCALa*, *BoPLD1*, *BoCALc*, *BoPC15*, которые также характеризовались высокими значениями индекса Шеннона (I) и числа эффективных аллелей (Ne). Уровень информационного содержания PIC находился в тесной зависимости ($r = 0,77, p < 0,001$) от количества выявляемых аллелей (рис. 2). Для локусов, обнаруживающих шесть и более аллелей, значения PIC преимущественно были выше в сравнении с остальными маркерами.

Генетическая дифференциация коллекции *Brassica oleracea* L.

При изучении генетической гетерогенности капусты белокачанной на основе полиморфизма EST-SSR рассчитаны генетические дистанции (GD) между образцами. Величина GD варьировала от 0,089 (Khal, Rot) до 0,573 (Sul, P19) со средним уровнем 0,333.

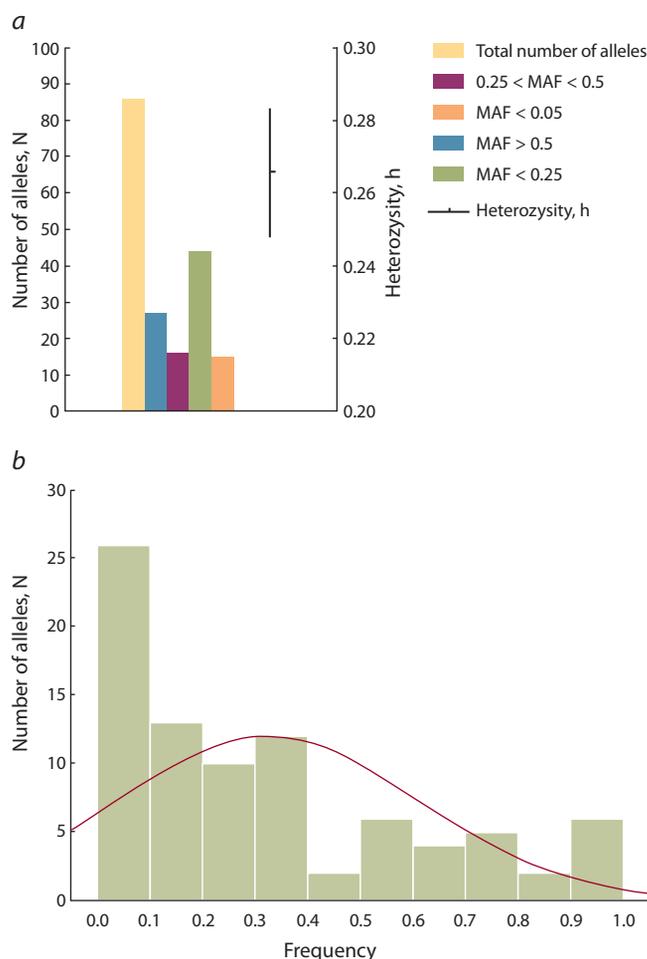


Fig. 1. Overall frequencies of alleles in the white cabbage collection: a, quantitative characterization; b, frequency distribution.

Исследование генетической структуры коллекции *B. oleracea* var. *capitata* L. на основе алгоритма STRUCTURE позволило предположить, что наиболее правильной с точки зрения логарифмической функции правдоподобия будет дифференциация при $K = 2$. Анализ главных компонент (PCA), основанный на подсчете частот SSR-аллелей, подтвердил дифференциацию экспериментальных форм на две группы подобия (рис. 2). В результате при вычленении основных влияющих факторов в различные координатные плоскости соотнесены группы образцов: (а) L576, L407, L577, L578, L264, L573, L860, L575, L574, L728, L783, L962, L583, L661, Alf, Rok, L580, Gran, P19 и (б) Khal, Rot, Sul, Ark, Gr, Uver, L251, Sem.

Установленные в ходе PCA-анализа группы соответствуют двум основным субкластерам классификационного дерева, построенного на основе алгоритма Nei для выявления топологической дифференциации и внутрисортного полиморфизма методом UPGMA (рис. 3). Максимальная величина межкластерных дистанций GD достигает 0,573. Согласно иерархической дифференциации, в I субкластер выделены две группы генетической общности: (а) L661, Gran, P19, Rok, Alf, L573, L580, L783,

Characterization of SSR markers

Acc. no. in GenBank/NCBI	Marker name	Gene source	Repeated motif	Annealing temperature, °C	Number of alleles	Allele size, bp	I	h	PIC
AF180355	BoABI1	isolate B265 ABI1 protein (ABI1) gene	(tc) ₁₆	59.5	4	160–173	0.353	0.214	0.554
CC956699	BoLAB20TR	genomic clone BolAB20	(cac) ₉	56.0	11	161–338	0.500	0.332	0.866
CC969507	BoLAB15TF	genomic clone BolAB15	(ct) ₅	56.0	4	218–302	0.158	0.071	0.193
U67451	BoAP1	homeotic protein boi1AP1 (Boi1AP1) mRNA	(at) _{9,1}	59.5	3	140–156	0.554	0.375	0.554
AF241115	BoCALa	isolate HRI/CGN 5688 caulifl wer gene	(at) ₅ (ta) ₆	59.5	9	204–234	0.404	0.252	0.803
AF241115	BoCALb	isolate HRI/CGN 5688 caulifl wer gene	(ta) _{6,1}	59.5	5	188–242	0.424	0.264	0.614
AF241115	BoCALc	isolate HRI/CGN 5688 caulifl wer gene	(taa) _{3,1} (at) _{7,1} (at) ₃	59.5	8	135–270	0.434	0.282	0.785
AF23069	BoDEL9	stearoyl-ACP desaturase (DELTA9-BO-1) gene	(ctt) ₃ (ct) ₆ (cttg) ₆	59.5	2	252–262	0.337	0.221	0.355
AF458409	BoDCTD1	deoxycytidine deaminase (DCTD1), mRNA	(aga) ₆	58.0	8	141–174	0.445	0.284	0.782
AF113918	BoPLD1	phospholipase D1 (PLD1) gene	(ct) ₇ (at) _{7,1}	56.0	7	258–302	0.436	0.275	0.748
AF113919	BoPLD2	phospholipase D2 (PLD2) gene	(at) ₆ (gt) ₅	56.0	6	160–254	0.284	0.177	0.601
X92955	BoPC15	mRNA for pollen coat protein	(tttta) ₂ (ata) ₇	56.0	6	161–184	0.495	0.329	0.784
X94979	BoPC34	mRNA for pollen coat protein (clone bopc34)	(atg) ₅	59.5	4	127–136	0.501	0.349	0.714
AF051772	BoREM1b	reproductive meristem gene 1 (REM1) mRNA	(gaa) ₅	58.0	5	153–172	0.424	0.267	0.633
AF273844	BoTHL1	thioredoxin-h-like protein 1 (THL1) mRNA	(ctt) ₇	56.0	4	140–149	0.349	0.214	0.520

Designations: I, Shannon's biodiversity index; h, heterozygosity index; PIC, polymorphic information content.

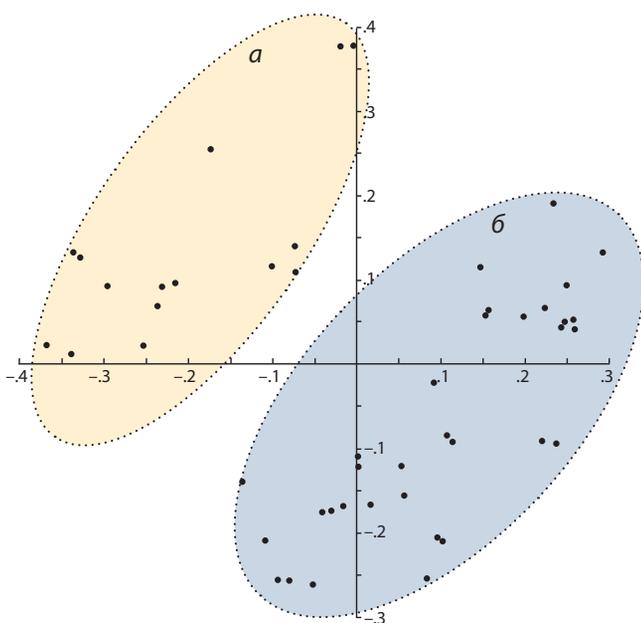


Fig. 2. Principal component analysis of white cabbage structure based on SSR evaluation. a and b, groups of distribution.

L583, L962; (б) L264, L574, L728, L575, L407, L578, L577, L576, L860. Здесь величина генетических дистанций (GD) варьирует от 0,137 до 0,444, в зависимости от топологии ветвления.

Восемь образцов (Khal, Rot, Sul, Ark, Gr, Uver, L251, Sem) с величиной межкластерных расстояний 0,102–0,346

образуют II субкластер. Наибольшая генетическая общность характеризует Khal и Rot. Образцы Uver и Sem топологически выделены отдельными ветвями, что обусловлено наличием у них уникальных сочетаний SSR-аллелей.

Обсуждение

Идентификация и характеристика различных генетических ресурсов имеют большое значение для отбора и типирования селекционных форм. Одним из наиболее эффективных инструментов оценки генетического полиморфизма являются микросателлиты, которые относятся к высокополиморфным маркерам растительных геномов. Среди них особый интерес представляют EST-SSR, которые непосредственно связаны с экспрессирующимися областями и широко используются для анализа генетического разнообразия и структуры популяций. Тем не менее многие исследования показали, что EST-SSR менее вариабельны, чем микросателлиты в некодирующих регионах (Cho et al., 2000; Eujay et al., 2002). В этом исследовании мы использовали 15 пар EST-SSR для изучения разнообразия и генетической дифференциации селекционной коллекции капусты белокочанной. Все оцененные локусы характеризовались высокой информативностью: 13 из 15 маркеров имели уровень PIC > 0,5, что позволило установить специфичные SSR-профили для каждого из исследуемых образцов. Полученные данные согласуются с результатами S. Louagn с коллегами (2007), которые использовали 11 пар «трансфербельных» SSR со сходным уровнем PIC для сортовой идентификации *B. oleracea*.

По результатам изучения аллельного состава SSR-локусов коллекции капусты белокочанной наиболее информативными оказались маркеры Bo20TR, BoDCTD4, BoPC34,

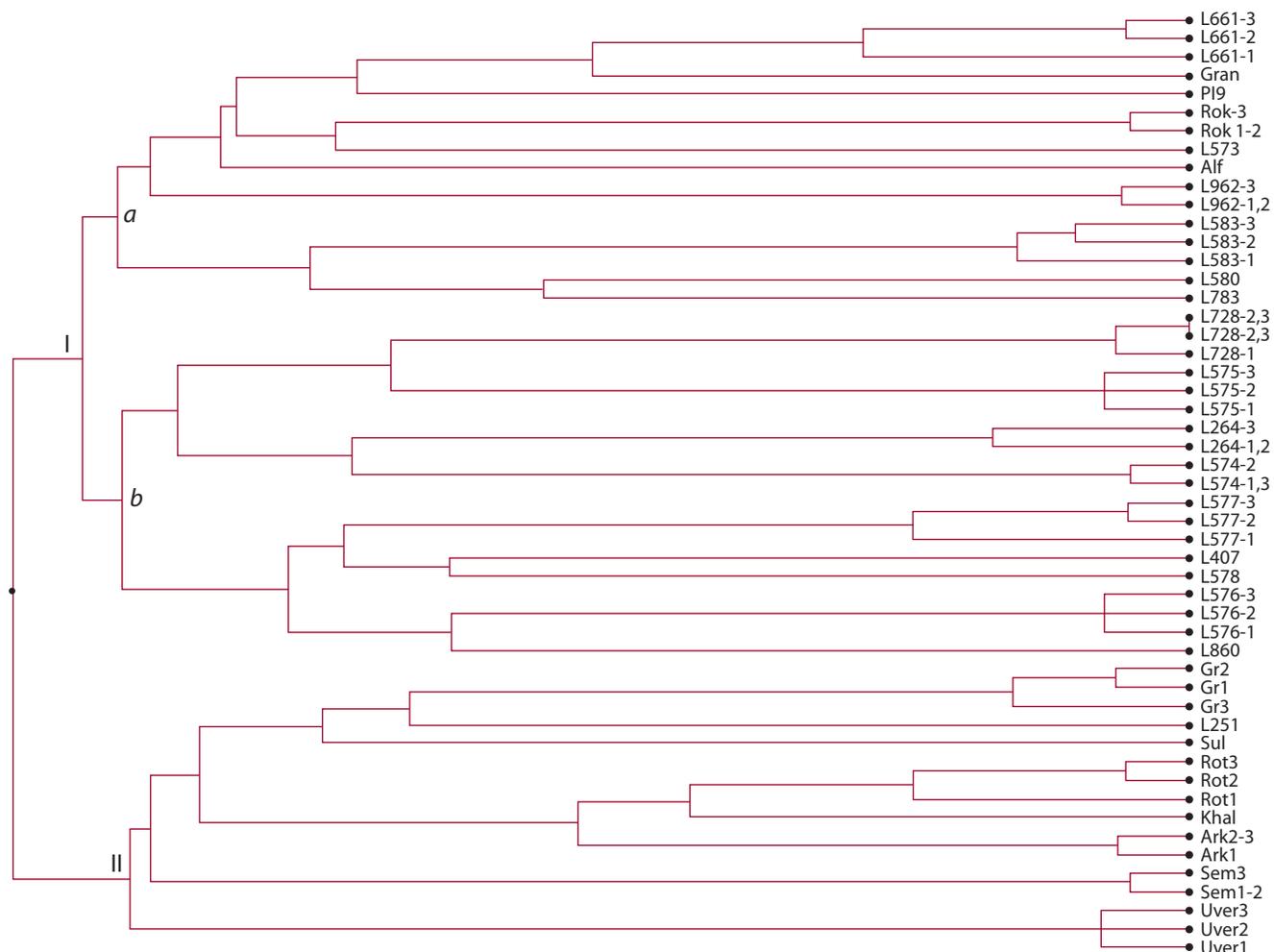


Fig. 3. Topological differentiation of the white cabbage collection by UPGMA.
a, b, groups of genetic similarity; I, II, subclusters.

BoPLD1, BoCalc, BoPC15, которые позволяют проводить как межсортовую, так и межлинейную дифференциацию *B. oleracea* var. *capitata*, включая типирование индивидуальных растений.

Высокое разнообразие экспериментальных форм свидетельствует о широкой генетической основе селекционной коллекции, которая преимущественно представлена образцами, полученными на основе сортов зарубежной селекции различного эколого-географического происхождения (Россия, Германия, Голландия). Межсортовой полиморфизм, выраженный в аллельном разнообразии изученных SSR-локусов, в значительной мере облегчает сортовую идентификацию и типирование индивидуальных растений при селекции.

Таким образом, наши результаты подтверждают, что EST-SSR могут успешно использоваться не только для оценки внутривидового разнообразия *B. oleracea*, но также для анализа меж- и внутрисортовой гетерогенности.

При изучении внутрисортового полиморфизма показано, что наиболее выровненными по аллельному составу SSR-локусов являются Gran, P19, Alf, L580, L783, L407, L578, L860, L573, L251 и Khal. Остальные образцы выявляют гетерогенность, которая, вероятно, связана с

высоким полиморфизмом исходных форм, вследствие чего для получения генетически выровненного поколения целесообразно провести семейственный отбор.

В результате исследования определены доноры редких аллелей: линии Gr, Alf, P19, Rot, Rok, L583, L578, L577, L573, L407, которые необходимо сохранять для поддержания разнообразия базовой коллекции, а также включать в гибридизацию с целью выделения ценных генетических сегрегаций.

Сгруппированные в I и II субкластеры образцы (рис. 3), несмотря на различное происхождение, с высокой вероятностью имеют общую предковую генетическую основу. Это может быть связано с использованием на ранних этапах селекции европейского региона ограниченного числа выдающихся генотипов. А. Belaj с коллегами (2003) в своих исследованиях отмечали, что в селекционных программах различных центров используются генетически идентичные элитные линии, но под разными названиями, что объясняет близкое родство сортов различного происхождения (Belaj et al., 2003).

Информация о топологической дифференциации коллекции капусты белокочанной, полученная в результате кластерного анализа, является основой для селекционного

отбора генетически выровненного материала, а также дивергентных комбинаций скрещивания при селекции на гетерозис.

Acknowledgments

This study was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, project B15-151.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Belaj A., Satovich Z., Ismaili H., Panajoti D., Rallo L., Trujillo I. RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. *Euphytica*. 2003;130:387-395. DOI 10.1023/A:1023042014081
- Bhargava A., Fuentes F.F. Mutational dynamics of microsatellites. *Mol. Biotechnol.* 2010;44(3):250-266. DOI 10.1007/s12033-009-9230-4
- Cho Y.G., Ishii T., Temnykh S., Chen X. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2000;100:713-722. DOI 10.1007/s001220051343
- Eujay I., Sorrells M.E., Baum M., Wolters P., Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2002;104:399-407. DOI 10.1007/s001220100738
- Fang Zh., Liu Y., Lou P., Liu G. Current trends in cabbage breeding. *J. New Seeds*. 2005;6(2/3):75-107. DOI 10.1300/J153v06n02_05
- Kapil A., Rai P.K., Shanker A. ChloroSSRdb: a repository of perfect and imperfect chloroplastic simple sequence repeats (cpSSRs) of green plants. Database. Online J. of Biological Databases and Curation. 2014. DOI 10.1093/database/bau107
- Kashi Y., King D.G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet.* 2006;22:253-259. DOI http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.00
- Katti M.V., Ranjekar P.K., Gupta V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2001;18:1161-1167. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003903
- Liu L., Liu G., Gong Y. Evaluation of genetic purity of F₁ hybrid seeds in cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR markers. *Hortscience*. 2007;42(3):724-727. (<http://hortsci.ashspublishings.org/content/42/3/724.full>)
- Louarn S., Torp A.M., Holme I.B., Andersen S.B., Jensen B.D. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea* L. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2007;54:1717-1725. DOI 10.1007/s10722-006-9181-6
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 2002;30:194-200. DOI 10.1038/ng822
- Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012;28:2537-2539.
- Pritchard M., Wen W., Falush D. Documentation for Structure Software: Version 2.3. Department of Human Genetic, Department of Statistics. University of Chicago USA, 2009. DOI <http://pritchardlab.stanford.edu/home.html>
- Reif J.C., Warburton M.L., Xia X.C., Hoisington D.A., Crossa J., Taba S., Muminovic J., Bohn M., Frisch M., Melchinger A.E. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2006;113:177-185. DOI 10.1007/s00122-006-0283-5
- Senan S., Kizhakayil D., Sasicumar B., Sheeja Th. Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Not. Sci. Biol.* 2014;6(1):1-13. (<http://notulaeobiologicae.ro/index.php/nsb/article/viewFile/9199/7883>)
- Tonguc M., Griffiths Ph.D. Genetic relationships of Brassica vegetables determined using database derived simple sequence repeats. *Euphytica*. 2004;137:193-201. DOI 10.1023/B:EUPH.0000041577.84388.43
- Ye Sh., Wang Y., Huang D., Li J., Gong Y., Xu L., Liu L. Genetic purity testing of F₁ hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Sci. Hortic.* 2013;155:92-96. DOI 10.1016/j.scienta.2013.03.016
- Zhang L., Yuan D., Yu Sh., Li Zh., Cao Y., Miao Zh., Qian H., Tang K. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*. 2004;20(7):1081-1086. DOI 10.1093/bioinformatics/bth043

Взаимодействие генов, определяющих форму колоса мягкой пшеницы и расположенных в хромосоме 5AL

А.В. Симонов¹, Т.А. Пшеничникова¹, И.Ф. Лапочкина², Н. Ватанабе³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Московский Научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Немчиновка», Московская область, Одинцовский район, пос. Новоивановское, Россия

³ Сельскохозяйственный колледж, Университет Ибараки, Ибараки, Япония

Признаки колоса гексаплоидных пшениц рода *Triticum* L. определяются главными генами и играют важную роль в систематике. Обладая сильным плеiotропным эффектом, они имеют также большую практическую значимость. Исследованы взаимодействия доминантных генов Q^5 и Q с геном C^{17648} , которые определяют форму колоса пшеницы. Доминантный ген Q находится в хромосоме 5AL и определяет образование у вида *T. spelta* L. удлиненного рыхлого колоса. Гомеоаллельный ген Q^5 , интрогрессированный в мягкую пшеницу от *Aegilops speltoides* Tausch. и вызывающий формирование спельтоидного колоса, также находится в хромосоме 5AL линии пшеницы 84/98^w. Ген C^{17648} аналогичен по фенотипическому проявлению гену C , определяющему развитие короткого плотного колоса на коротком стебле, подобно виду *T. compactum* Host. Он был картирован в хромосоме 5AL у линии мягкой пшеницы ANBW-5A, а его донором был мутант твердой пшеницы. В данной работе у гибридов F_1 , F_2 и F_3 трех различных популяций изучались длина колоса, число колосков в колосе, индекс плотности колоса и длина стебля. Впервые было установлено, что доминантный ген C^{17648} эпистатичен по отношению к доминантным генам Q^5 и Q . Это проявилось в образовании компактного колоса у гибридов F_1 и численном преобладании растений с компактным колосом в F_2 . Вместе с тем установлено, что на длину стебля у гибридов ген C^{17648} оказывал меньшее действие, чем гены Q^5 и Q , и не влиял на число колосков в колосе. С помощью генетического анализа установлено, что гены Q^5 или Q наследуются независимо от гена C^{17648} , однако наблюдалось значительное сцепление между Q^5 или Q с геном $b1$.

Ключевые слова: мягкая пшеница; генетический анализ; гибридизация; гены формы колоса; спельтоидность и компактность колоса.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Симонов А.В., Пшеничникова Т.А., Лапочкина И.Ф., Ватанабе Н. Взаимодействие генов, определяющих форму колоса мягкой пшеницы и расположенных в хромосоме 5AL. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):57-64. DOI 10.18699/VJ15.115

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Simonov A.V., Pshenichnikova T.A., Lapochkina I.F., Watanabe N. Interaction of genes determining the spike shape of wheat and located in 5AL chromosome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):57-64. DOI 10.18699/VJ15.115

ORIGINAL ARTICLE

Received 29.07.2015 r.

Accepted for publication 06.11.2015 r.

Online 15.12.2015 r.

© AUTHORS, 2015

✉ e-mail: sialexander@bionet.nsc.ru

Interaction of genes determining the spike shape of wheat and located in 5AL chromosome

A.V. Simonov¹, T.A. Pshenichnikova¹,
I.F. Lapochkina², N. Watanabe³

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

² Moscow Scientific Research Institute of Agriculture «Nemchinovka», Moscow oblast, Odintsovo region, Novoivanovskoe, Russia

³ College of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki, Japan

Spike parameters of hexaploid wheats from the genus *Triticum* L. are determined by the major genes and play an important role in systematics. Having a strong pleiotropic effect, they also have practical importance. In this work, the interaction of the dominant genes Q^5 and Q with the dominant gene C^{17648} determining a spike shape was investigated. The gene Q is situated in 5AL chromosome and determines the formation of elongated lax spike in the species *T. spelta* L. The homoeoallelic gene Q^5 introgressed into bread wheat from *Aegilops speltoides* Tausch. and causing the formation of the speltoid spike is also located in 5AL chromosome of the line 84/98^w. The gene C^{17648} is analogous in the phenotypic manifestation to the gene C determining the formation of a dense short spike on a short culm like in *T. compactum* Host. It was mapped to 5AL chromosome in bread wheat line ANBW-5A and the donor of the gene was a mutant of durum wheat. In the present work, spike length, spikelet number, index of spike density and stem length were studied in F_1 , F_2 and F_3 of three different hybrid populations. It was for the first time shown that the gene C^{17648} is epistatic to the dominant genes Q^5 and Q . It was manifested in the formation of compact spikes in F_1 hybrids and in the numerical predominance of plants with a compact spike in F_2 . At the same time, the gene C^{17648} showed a smaller effect on stem length and did not affect spikelet number. Using the genetic analysis, it was found that the genes Q^5 and Q are independently inherited from the gene C^{17648} , although a substantial linkage was observed between Q^5 or Q and $b1$ gene.

Key words: bread wheat; genetic analysis; hybridization; genes for spike shape; spike speltoidy and compactness.

Виды гексаплоидных пшениц (ВВААDD) характеризуются отличительными признаками колоса, имеющими таксономическое, хозяйственное и доместикационное значение. Так, например, пшеница с разреженным удлинённым колосом, жесткими чешуями и ломким колосовым стержнем, плохим обмолотом относится к виду *T. spelta* L. (спельта). Плотноколосая и относительно низкорослая пшеница относится к виду *T. compactum* Host (компактум). Вид *T. aestivum* L. (мягкая пшеница) не имеет таких особенностей. Перечисленные признаки контролируются единичными доминантными генами с плейотропным эффектом. Данные гены влияют не только на форму колоса, но и на фенотип растения в целом: его высоту, время колошения и цветения (De Fariis et al., 2003). В каталоге генных символов пшеницы (McIntosh et al., 2013) они приведены в разделе генов «большой морфологии» (Gross Morphology).

Ген *Q*, определяющий различия между спельтой и мягкой пшеницей по форме колоса, был картирован в длинном плече хромосомы 5A (Kato et al., 1998). При гибридизации спельты с мягкой пшеницей было установлено, что специфическая форма колоса (спельтоидная) – доминирующий признак (McFadden, Sears, 1946; Филипченко, 1979; Гончаров, 2002). У интрогрессивной линии из коллекции «Арсенал» с генетическим материалом от *Aegilops speltoides* Tausch. (Lapochkina et al., 2001) нами был обнаружен ген *Q^S* в хромосоме 5A, гомеоаллельный известному гену *Q* спельты (Симонов, Пшеничникова, 2012). Ген *Q^S* так же, как и ген *Q* спельты, доминантен и определяет спельтоидную форму колоса.

Доминантный ген *C*, вызывающий плотноколосость и карликовость растения, картирован в хромосоме 2DL у *T. compactum* (Johnson et al., 2008). Аналоги гена *C* с таким же фенотипическим эффектом найдены в хромосоме 5AL у нескольких компактноколосых мутантов мягкой и твердой пшеницы (Kosuge et al., 2008, 2012). Первоначально они получили разные обозначения с индексами *C¹⁷⁶⁴⁸*, *C⁷³⁹* и *C_p*, но потом была показана их аллельность (Kosuge et al., 2012). Ген *C¹⁷⁶⁴⁸* был перенесен в геном мягкой пшеницы от мутанта твердой пшеницы. Он расположен в длинном плече хромосомы 5AL в районе между молекулярным маркером *Xbarc319* и ингибитором остистости *B1* на значительном от них расстоянии (Kosuge et al., 2012).

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить характер взаимодействия двух генов, расположенных в хромосоме 5A и контрастно влияющих на форму колоса и высоту растения пшеницы. Для этого у носителей доминантных генов *Q*, *Q^S* и *C¹⁷⁶⁴⁸* был проведен генетический анализ формы колоса и длины стебля.

Материалы и методы

Источником доминантного аллеля гена *Q*, вызывающего спельтоидность колоса, стал образец *T. spelta* Grey, предоставленный Э. Ворландом (Центр Джона Иннеса, Норидж, Великобритания). В качестве носителя гомеоаллельного доминантного гена *Q^S*, интрогрессированного от *Ae. speltoides*, были использованы озимая линия 84/98^w из коллекции «Арсенал» (Lapochkina, 2001) и ее яровой аналог, линия Rodina *Q^S*, созданная нами. Перечисленные линии

имеют спельтоидный фенотип колоса. В качестве родителя с компактным колосом (компактоид) была использована изогенная линия ANBW-5A, несущая ген *C¹⁷⁶⁴⁸* (Kosuge et al., 2012). В табл. 1 перечислены родительские формы и их генотипы.

Изучали гибриды первого, второго и выборочно третьего поколений по трем гибридным комбинациям: *T. spelta* Grey × ANBW-5A, Rodina *Q^S* × ANBW-5A и 84/98^w × ANBW-5A. Всего было изучено в популяциях F₁ по 6, 5 и 13 растений соответственно, а в популяциях F₂ – 50, 130 и 120 растений соответственно. В гибридной популяции F₂ 84/98^w × ANBW-5A из 120 растений было 103 яровых, фенотипированных по признакам колоса. Также было фенотипировано по шесть растений от 42 семей F₃ для проверки гомо- или гетерозиготности растений из F₂ с разными фенотипами колоса.

У полученных гибридов F₁ и F₂, а также у родителей изучали такие параметры, как «длина колоса», «число колосков в колосе», «индекс плотности колоса», рассчитываемый как число колосков на 10 см длины колоса, а также «длина стебля».

Для оценки достоверности количественных различий между родительскими линиями и гибридами F₁ использовали однофакторный дисперсионный анализ популяций с оценкой достоверности по критерию Фишера (F) и расчетом наименьшей существенной разницы (НСР) (Доспехов, 1985). Соответствие фактического соотношения фенотипических классов теоретическому соотношению в F₂ определялось по критерию χ^2 (Рокицкий, 1974). При обработке данных использовались статистические пакеты Past и MS Excel.

Исследования проведены в Центре коллективного пользования «Лаборатория искусственного выращивания растений ИЦиГ СО РАН» (г. Новосибирск) в течение 2014–2015 гг. Растения выращивали в гидропонных теплицах с керамзитным грунтом, автоподачей питательного раствора Кнопа и искусственной подсветкой.

Результаты

При сравнении гибридов F₁ с родительскими линиями было установлено, что отдельные изучаемые признаки колоса и стебля проявляются неодинаково (табл. 2–4). Так, длина колоса гибридов F₁ была меньше родительского среднего и ближе к линии ANBW-5A. Данные отличия достоверны во всех комбинациях. Это наиболее ярко демонстрирует комбинация *T. spelta* Grey × ANBW-5A, у которой колосья гибридов F₁ имели колос на 1,3 см длиннее, чем у родителя с компактным колосом, но на 1,8 см короче среднего по длине колосьев обоих родителей (табл. 4). Индекс плотности колоса, как зависимый от длины колоса параметр, у гибридов F₁ всех трех комбинаций был выше родительского среднего и ближе к индексу линии ANBW-5A.

В случае комбинации *T. spelta* Grey × ANBW-5A между растениями F₁ и линии ANBW-5A по этому признаку не было достоверной разницы (индекс плотности 34,2 и 37,3 соответственно) (табл. 4).

Число колосков колоса у всех трех популяций гибридов F₁ достоверно превышало родительское среднее. При этом число колосков колоса у гибридов F₁ Rodina *Q^S* ×

Table 1. Parental forms and their genotypes for spike traits and growth habit

Parents	Characteristic alleles			
<i>T. spelta</i> Grey	<i>Q</i>	<i>c</i> ¹⁷⁶⁴⁸	<i>b1</i>	<i>Vrn-A1</i>
Rodina <i>Q</i> ^S	<i>Q</i> ^S	<i>c</i> ¹⁷⁶⁴⁸	<i>b1</i>	<i>Vrn-A1</i>
84/98 ^w	<i>Q</i> ^S	<i>c</i> ¹⁷⁶⁴⁸	<i>b1</i>	<i>vrn-A1 (vrn-S1)</i>
ANBW-5A	<i>q (q</i> ^S <i>)</i>	<i>C</i> ¹⁷⁶⁴⁸	<i>B1</i>	<i>Vrn-A1 + Vrn-B1</i>

Table 2. Mean values of spike and stem parameters in the parental forms and F₁ hybrids 84/98^w × ANBW-5A

Genotype	Spike length, cm	Spikelet number	Density index	Stem length, cm
ANBW-5A	3.1	11.2	37.3	26.9
84/98 ^w	9.9	15.2	15.4	69.4
Parental mean	6.5	13.2	26.4	48.2
F ₁ 84/98 ^w × ANBW-5A	5.6	16.8	29.9	59.2
F	3.5			
F _G	71.7***	17.8***	55.3***	95.9***
LSD ₀₅	0.9	1.7	3.3	5.5

*** *p* < 0.001.**Table 3.** Mean values of spike and stem parameters in the parental forms and F₁ hybrids Rodina *Q*^S × ANBW-5A

Genotype	Spike length, cm	Spikelet number	Density index	Stem length, cm
ANBW-5A	3.1	11.2	37.3	26.9
Rodina <i>Q</i> ^S	8	13.8	17.2	54.9
Parental mean	6.6	12.5	27.3	40.9
F ₁ Rodina <i>Q</i> ^S × ANBW-5A	5.2	15.5	29.8	51.2
F	3.2			
F _G	251.9***	25.2***	173.0***	96.0***
LSD ₀₅	0.5	1.1	2.6	4.2

*** *p* < 0.001.**Table 4.** Mean values of spike and stem parameters in the parental forms and F₁ hybrids *T. spelta* Grey × ANBW-5A

Genotype	Spike length, cm	Spikelet number	Density index	Stem length, cm
ANBW-5A	3.1	11.2	37.3	26.9
<i>T. spelta</i> Grey	9.2	14.2	15.5	53.3
Parental mean	6.2	12.7	26.4	40.1
F ₁ <i>T. spelta</i> Grey × ANBW-5A	4.4	14.8	34.2	46
F	3.3			
F _G	216.2***	15.9***	118.6***	88.6***
LSD ₀₅	0.6	1.4	3.1	4.9

*** *p* < 0.001.



Fig. 1. Characteristic spike shapes of parental forms and F_1 and F_2 in the cross combination Rodina $Q^S \times$ ANBW-5A. From left to right: 1, Rodina Q^S ; 2, ANBW-5A; 3, F_1 ; 4–13, F_2 spikes attributed to the compact phenotype; 14, speltoid F_2 ; 15, normal F_2 .

Table 5. Mean values with errors for parental forms and variability limits for F_2 hybrid populations in comparison with parents

Genotype	Spike length, cm	Spikelet number	Density index	Stem length, cm
ANBW-5A	4.1 ± 0.3	14.1 ± 1.3	34.3 ± 2.3	41.4 ± 4.7
84/98 ^w	13.5 ± 1.2	19.4 ± 1.9	14.4 ± 0.8	95.4 ± 10.4
Rodina Q^S	9.8 ± 0.5	15.1 ± 0.8	15.3 ± 1.0	78.0 ± 3.3
<i>T. spelta</i> Grey	11.9 ± 1.2	18.3 ± 1.2	15.7 ± 1.7	93.1 ± 7.7
F_2 84/98 ^w × ANBW-5A	6.4 2.0–14.6	16.6 10–27	28.3 12.6–50.0	66.6 12–114
Parental mean	8.6	16.5	24.3	67.0
F_2 Rodina Q^S × ANBW-5A	5.5 1.5–11.3	13.6 7–18	27.3 13.3–48.0	54.7 8–99
Parental mean	7.0	14.6	24.7	59.8
F_2 <i>T. spelta</i> Grey × ANBW-5A	6.0 3.0–11.8	14.7 12–20	29.1 12.7–46.9	66.1 30–102
Parental mean	8.0	16	24.9	65.7

× ANBW-5A было достоверно выше на 1,7, чем у линии Rodina Q^S (см. табл. 3). Достоверных различий между гибридами F_1 и их спельтоидными родителями в комбинациях 84/98^w × ANBW-5A и *T. spelta* Grey × ANBW-5A не было (см. табл. 2, 4). Колосья родителей и гибридов одной из гибридных популяций представлены на рис. 1.

Значения длины стебля у гибридов F_1 трех комбинаций были достоверно выше средних длин стебля между родителями и близки к соответствующим спельтоидным родителям. В комбинации Rodina Q^S × ANBW-5A значения длины стебля гибридов F_1 не только достоверно выше родительского среднего, но и не отличаются достоверно от линии Rodina Q^S (см. табл. 3).

В табл. 5 приведены сравнительные количественные данные признаков колоса и стебля у гибридов F_2 и родителей всех гибридных комбинаций. Здесь можно отметить двустороннюю трансгрессию по всем изученным признакам, что может указывать на минорные модификаторы колоса и стебля, по которым различались родительские формы.

Средние значения длины колоса у гибридов F_2 были от 5,5 до 6,4 см, что примерно на 1/4 ниже родительских средних (от 7 до 8,6 см) (табл. 5). Они приближались к среднему значению родительской линии ANBW-5A (4,1 см). Средние значения индекса плотности колоса у гибридов F_2 , составившие значения от 27,3 до 29,1,

были несколько выше родительского среднего (24,3–24,9) (табл. 5). Эти значения были ближе к родителю с компактным колосом (34,3), чем к спельтоидным родителям (14,4–15,7). Среднее число колосков в колосе и средняя длина стебля у растений в популяциях F_2 были довольно близки соответствующим родительским средним значениям (табл. 5). Таким образом, в F_2 наблюдалось численное преобладание растений с компактным колосом над спельтоидными растениями.

Из приведенных данных следует, что ген C^{17648} подавлял действие генов Q^S и Q на длину и плотность колоса. Это указывает на эпистатическое взаимодействие между данными генами формы колоса. Исходя из этого для генетического анализа было использовано теоретическое соотношение возможных фенотипических классов 12 : 3 : 1 (Рокицкий, 1974). На рис. 2 представлено распределение гено- и фенотипов согласно схеме дигибридного расщепления при эпистатическом взаимодействии доминантных генов. Следует отметить, что рецессивные аллели c^{17648} и q^S (q) вызывают образование характерного для мягкой пшеницы нормального колоса (Филипченко, 1979; Гончаров, 2002; Симонов и др., 2009; Kosuge et al., 2012). Таким образом, все гибридные растения популяций F_2 были объединены в три фенотипических класса: растения с компактным, спельтоидным и нормальным колосом. Растения F_2 с нормальным колосом имеют рецессивные аллели данных генов и далее не расщепляются. Гибриды F_2 со спельтоидным колосом могут быть как гомо-, так и гетерозиготами, расщепляющимися в F_3 на спельтоидные и нормальные фенотипы. Растения с компактным колосом могут быть константными или давать потомство со всеми тремя фенотипами. Анализ 42 семей F_3 эти предположения подтвердил. Среди предков F_2 с компактным и спельтоидным колосом присутствовали как гомо-, так и гетерозиготы, расщепляющиеся на соответствующие классы.

Фактическое расщепление по форме колоса для каждой популяции F_2 приведено в табл. 6. Как можно видеть, статистически достоверно теоретическому соотношению 12 : 3 : 1



Fig. 2. Segregation for spike shape in F_2 populations under epistatic interaction of Q^S and C^{17648} genes and the corresponding phenotypes .

Phenotypes: c, compact; s, speltoid; n, normal.

соответствовало расщепление в популяциях F_2 *T. spelta* Grey × ANBW-5A и F_2 Rodina Q^S × ANBW-5A. В популяции F_2 84/98^w × ANBW-5A расщепление по форме колоса не соответствовало теоретическому (табл. 6). В ней наблюдались недостаток компактных форм и избыток растений с нормальным колосом. Также данная популяция расщеплялась на 103 яровых и 17 озимых растений, что не соответствовало дигибридному расщеплению 15 : 1 ($\chi^2 = 12,8; p > 0,05$) при учете двух генов, *Vrn-A1* и *Vrn-B1*, ярового типа развития в генотипе линии ANBW-5A.

В хромосоме 5A в теломерном районе длинного плеча также находится ген *B1*, ингибирующий остистость. Доминантный аллель гена *B1* несет

Table 6. Segregation of dihybrid F₂ populations according to spike morphology into compact, speltoid, and normal plants in the epistatic interaction of the Q^S and C¹⁷⁶⁴⁸ spike morphology genes

Segregation	Spike phenotype			Total	χ ² (12:3:1)	p
	compact	speltoid	normal			
F ₂ <i>T. spelta</i> Grey × ANBW-5A						
expected	37	9	3	49	5.77	0.10–0.05
actual	33	15	1	49		
F ₂ 84/98 ^w × ANBW-5A						
expected	77	19	7	103	116.31	not significant
actual	47	22	34	103		
F ₂ Rodina Q ^S × ANBW-5A						
expected	97	24	8	129	1.87	0.5–0.25
actual	91	30	8	129		

Table 7. Segregation in F₂ into awnless and awned plants with regard to spike shape

Segregation	Spike phenotype								
	compact			speltoid			normal		
	awnless	awned	χ ² (3:1)	awnless	awned	χ ² (3:1)	awnless	awned	χ ² (3:1)
F ₂ <i>T. spelta</i> Grey × ANBW-5A									
expected	25	8	1.49*	11	4	12.3	–	–	–
actual	28	5		5	10		0	1	
F ₂ 84/98 ^w × ANBW-5A									
expected	35	12	16.1	17	5	6.47	26	8	10.5
actual	47	0		0	22		34	0	
F ₂ Rodina Q ^S × ANBW-5A									
expected	68	23	14.9	23	7	47.7	6	2	–
actual	84	7		7	23		6	2	

* 0.10 < p < 0.25 (χ²_{crit} = 3.84).

безостая линия ANBW-5A, все остальные родители являются остистыми и несут рецессивный аллель *bl*. Поэтому все три популяции были изучены по наличию или отсутствию остей у растений. Расщепление на безостые и остистые растения популяции F₂ *T. spelta* Grey × ANBW-5A составило 33 : 16 (χ² = 1,53; p > 0,1), популяции F₂ 84/98^w × ANBW-5A – 81 : 22 (χ² = 0,73; p > 0,25), а популяции F₂ Rodina Q^S × ANBW-5A – 97 : 32 (χ² = 0,003; p > 0,99), что достоверно соответствует моногенному расщеплению 3 : 1. Для того чтобы оценить сцепление этого гена с генами формы колоса, дополнительно было оценено по безостости/остистости расщепление внутри фенотипических классов компактных и спельтоидных растений (табл. 7).

В популяции F₂ 84/98^w × ANBW-5A все остистые растения были спельтоидными, а безостые имели компактный или нормальный колос. При этом рекомбинанты – остистые компактоиды – отсутствовали. Среди растений с ком-

пактным колосом популяции F₂ *T. spelta* Grey × ANBW-5A расщепление на безостые и остистые соответствует формуле 3 : 1 (табл. 7). В популяции F₂ Rodina Q^S × ANBW-5A среди компактоидов встречались остистые растения, хотя их и не хватало для достоверного соответствия расщеплению 3 : 1. Среди спельтоидных растений в обеих упомянутых популяциях остистых растений было больше, чем безостых. Следовательно, рекомбинация между хромосомами 5A *T. spelta* Grey и линии Rodina Q^S, с одной стороны, и хромосомой 5A линии ANBW-5A, с другой, в районе генов *Bl*, Q^S (*Q*) и C¹⁷⁶⁴⁸ происходит, но частота ее снижена.

Обсуждение

Наследование изученных признаков контролируется генами, относящимися к генам «большой морфологии» (McIntosh et al., 2013), поскольку они имеют большое влияние на фенотип растения. Их аллельное состояние

определяет форму колоса и используется наряду с другими признаками для разделения гексаплоидных пшениц (ВВААДД) на виды. Наиболее изученным является ген *Q*. Он отнесен к семейству транскрипционных факторов APETALA-2, контролирующих развитие цветка у растений (De Faris et al., 2003). Изменение всего в одной паре нуклеотидов в аллелях гена *Q* (Simons et al., 2006) имело большое значение для доместикации пшеницы. Вместо длинного, ломкого и с трудом обмолачиваемого колоса спелты (доминантный аллель) появился колос с легко разрушающимися колосками и упругим стержнем (рецессивный аллель) – важным свойством для возделываемой пшеницы. Помимо формы колоса этот ген оказывает влияние на высоту растения и время колошения (De Faris et al., 2003). Рядом исследователей показана экспрессия данного гена не только в тканях органов цветка, но также в других частях растения – листьях, стеблях и корнях (Simons et al., 2006; Gil-Humanes et al., 2009). Экспрессирующийся ген *Q* находится в хромосоме 5AL; в гомеологичных хромосомах 5B и 5D пшеницы найдены аналогичные последовательности (Simons et al., 2006), но их действия на фенотип не обнаружено.

Про ген *C* известно значительно меньше. У вида пшеницы *T. compactum* ген *C* был локализован и картирован в хромосоме 2DL (Johnson et al., 2008). Он, в противоположность гену *Q*, воздействует на растение, уменьшая длину колоса и стебля, в результате чего развивается низкорослое растение с плотным колосом (Johnson et al., 2008). Признак доминантен по отношению к обычному колосу мягкой пшеницы. У полученных независимо нескольких мутантов мягкой и твердой пшеницы в хромосоме 5A обнаружены также доминантные мутации с аналогичным гену *C* фенотипическим проявлением (Kosuge et al., 2008, 2012). Однако они не аллельны гену *C*.

В этой работе впервые изучены взаимодействие и положение относительно друг друга на хромосоме 5AL двух доминантных генов с противоположным эффектом на морфологию колоса и стебля. Из данных наших таблиц следует, что ген *C¹⁷⁶⁴⁸* частично эпистатичен по отношению к генам *Q^S* и *Q*. Согласно данным табл. 2–4, длина колоса и индекс плотности у гибридов F₁ уклонялись в сторону родительской формы с компактным колосом. В F₂ большинство растений было компактоидного типа (см. табл. 5) во всех изученных гибридных комбинациях. Действие гена *C¹⁷⁶⁴⁸* выражалось в значительном уплотнении колоса, особенно его верхушки. В меньшей степени его действие сказывалось на длине стебля, период роста которого происходит значительно позже периода закладки колоса. Можно предположить, что активность гена *C¹⁷⁶⁴⁸* имеет свой временной пик при формировании колоса на стадии кушения, впоследствии она ослабевает. Наиболее активно ген *C¹⁷⁶⁴⁸* проявил себя на первичном побеге, который имел, как правило, меньшую длину и более компактный колос, чем вторичные и третичные побеги. По мере ослабления экспрессии гена *C¹⁷⁶⁴⁸* сильнее выражалось действие генов *Q^S* и *Q*. Фенотипически это проявлялось через удлинение основания колоса и особенно стебля. Следует отметить, что действие гена *C¹⁷⁶⁴⁸* не распространялось на признак «число колосков», который в гибридах уклонялся в сторону спельтоидного родителя.

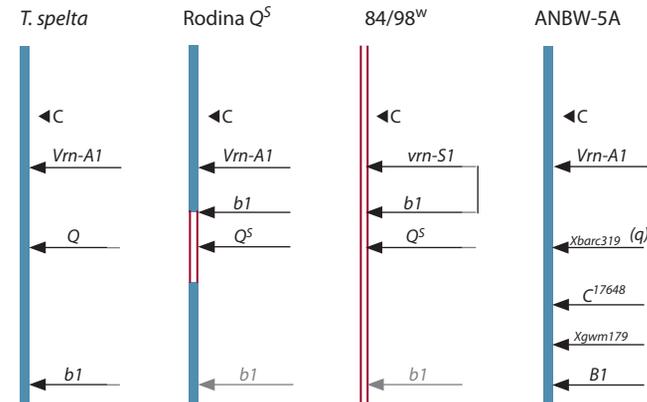


Fig. 3. Schematic location of genes *Vrn-1*, *Q*, *Q^S*, *C¹⁷⁶⁴⁸* and *B1* on chromosome 5AL in the studied lines (according to Kato et al., 1998; Simonov et al., 2009; Kosuge et al., 2012) without considering the distances between genes.

c, centromere.

Взаимное расположение изучавшихся генов в исследованном генетическом материале представлено на рис. 3. Из наших предыдущих исследований известно, что озимая линия 84/98^w несет большую интрогрессию в хромосоме 5A (а возможно, и полное замещение) от хромосомы 5S вида *Ae. speltoides*, осложненной наличием инверсии в районе генов *vrn-S1-b1* (Симонов и др., 2009). Это существенно затрудняло получение ярового аналога озимой линии 84/98^w путем скрещивания ее с яровой линией 170/98i из коллекции «Арсенал». Первое гомозиготное яровое спельтоидное растение удалось получить только в пятом поколении, оно и стало родоначальником яровой спельтоидной линии Rodina *Q^S*. В данной работе также не выявлена рекомбинация в этой области хромосомы 5AL при скрещивании линии 84/98^w с яровой изогенной линией ANBW-5A. Яровая линия Rodina *Q^S* несет в хромосоме 5A меньший интрогрессированный участок в сравнении с озимой линией 84/98^w, что дает возможность ограниченной рекомбинации гомологичных хромосом (рис. 3). Хромосома 5AL спелты имеет обычный порядок генов. Из анализа F₂ *T. spelta* Grey × ANBW-5A и F₂ Rodina *Q^S* × ANBW-5A следует, что гены *Q* или *Q^S* находятся на значительном расстоянии от гена *C¹⁷⁶⁴⁸*, поскольку были получены рекомбинанты с нормальным колосом в этих популяциях (см. табл. 6). Это согласуется с данными, полученными ранее для мягкой пшеницы (Kosuge et al., 2012).

Однако в наших опытах была обнаружена определенная зависимость наследования безостости/оститости от формы колоса. Генетическим анализом показано, что среди гибридов F₂ 84/98^w × ANBW-5A не было растений спельтоидных безостых или остистых с компактным колосом (табл. 7). Это говорит о затрудненной рекомбинации в связи с инверсией интрогрессированного участка. В сравнении с линией 84/98^w, линия Rodina *Q^S* несет меньший интрогрессированный участок, и рекомбинанты среди F₂ Rodina *Q^S* × ANBW-5A с безостым спельтоидным и остистым компактным колосом были получены, хотя их число ниже теоретически ожидаемого. Следовательно, рекомбинация на данном участке затруднена в меньшей

степени. Однако среди спельтоидных растений популяций F_2 *T. spelta* Grey × ANBW-5A тоже были обнаружены избыток остистых и нехватка безостых растений (табл. 7). Данное отклонение не связано с интрогрессией. Это явление нуждается в дополнительном исследовании.

Таким образом, установлено эпистатическое действие гена C^{17648} на гены Q^S и Q , выражающееся в уменьшении длины колоса и уплотнении его верхушки, а также в некотором уменьшении длины стебля. Множественный эффект гена на фенотип растения позволяет отнести его к группе генов «большой морфологии». Не было обнаружено влияния этого гена на число колосков. Двусторонняя трансгрессия признаков колоса в F_2 предполагает присутствие в геноме пшеницы дополнительных минорных генов-модификаторов формы колоса и длины стебля.

Acknowledgments

The authors are grateful to Yulia Gulyako for assistance in the collection and phenotyping of hybrid spikes.

This work was supported by State budgeted project VI.53.1.3.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- De Faris J., Fellers J.P., Brooks S.A., Gill B.S. Bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus Q in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics*. 2003;164:311-321.
- Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniy) [Methods of Field Experiments and Fundamentals of Statistical Evaluation]. Moscow, Agropromizdat, 1985.
- Filipchenko A.Yu. Genetika myagkikh pshenits. Pod red. V.F. Lyubimovoy [Genetics of Common Wheats. Ed. by V.F. Lyubimova]. Moscow, Nauka, 1979.
- Gil-Humanes J., Pistón F., Martín A., Barro F. Comparative genomic analysis and expression of the APETALA2-like genes from barley, wheat, and barley-wheat amphiploids. *BMC Plant Biol*. 2009;9:66. DOI 10.1186/1471-2229-9-66
- Goncharov N.P. Sravnitel'naya genetika pshenits i ikh sorodichey [Comparative Genetics of Wheats and Their Related Species]. Novosibirsk, Sib. univ. izd-vo, 2002.
- Johnson E.R., Nalam V.J., Zemetra R.S., Riera-Lizarazu O. Mapping the compactum locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to other spike morphology genes of the Triticeae. *Euphytica*. 2008;163:193-201. DOI 10.1007/s10681-007-9628-7
- Kato K., Miura H., Akiyama M., Kuroshima M., Sawada S. RFLP mapping of three major genes, $Vrn1$, Q and $B1$ on the long arm of chromosomes 5A of wheat. *Euphytica*. 1998;101:91-95.
- Kosuge K., Watanabe N., Kuboyama T., Melnik V.M., Yanchenko V.I., Rosova M.A., Goncharov N.P. Cytological and microsatellite mapping of mutant genes for spherical grain and compact spike in durum wheat. *Euphytica*. 2008;159:289-296. DOI 10.1007/s10681-007-9488-1
- Kosuge K., Watanabe N., Melnik V.M., Laikova L.I., Goncharov N.P. New sources of compact spike morphology determined by the genes on chromosome 5A in hexaploid wheat. *Genet. Resour. Crop Evol*. 2012;59:1115-1124. DOI 10.1007/s10722-011-9747-9
- Lapochkina I.F. Genetic diversity of "Arsenal" collection and its use in wheat breeding. *Abstr. Int. Appl. Sci. Conf. "Genetic Resources of Cultural Plants"*. St. Petersburg. November 13-16, 2001:133-135.
- McFadden E.S., Sears E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Heredity*. March. 1946;XXXVII(3):81-89. (Continued from the March Issue) *Heredity*. March. 1946;XXXVII(4):107-115.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Roger J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12th Int. Wheat Genetics Symp. Yokohama. Japan. 8-13 September. 2013.
- Rokitskiy P.F. Vvedenie v statisticheskuyu genetiku [Introduction to Statistical Genetics]. Minsk, Vysheyschaya shkola, 1974.
- Simonov A.V., Pshenichnikova T.A. Chromosomal localization of the speltoidy gene, introgressed into bread wheat from *Aegilops speltoides* Tausch., and its interaction with the Q gene of *Triticum spelta* L. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2012;48(11):1306-1313.
- Simonov A.V., Pshenichnikova T.A., Lapochkina I.F. Genetic analysis of the traits introgressed from *Aegilops speltoides* Tausch. to bread wheat and determined by chromosome 5A genes. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2009;45(7):913-919.
- Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N., Zhang Z., Tai Y.-S., Gill B.S., Faris J.D. Molecular characterization of the major wheat domestication gene Q . *Genetics*. 2006;172:547-555.



Роль белка Pnut и его функциональных доменов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*

К.А. Ахметова^{1,2}, Н.В. Дорогова¹, Е.У. Болоболова¹, И.Н. Чесноков², С.А. Федорова^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Университет Алабамы в Бирмингеме, Бирмингем, США

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Белок Pnut дрозофилы принадлежит к семейству септинов – консервативных ГТФаз, участвующих в цитокinesis и других фундаментальных клеточных процессах. В связи с их способностью формировать комплексы, которые могут затем полимеризоваться в филаменты, а также на основе их взаимодействия с клеточной мембраной и выполняемыми функциями септины стали рассматривать как четвертую составляющую цитоскелета наряду с актином, микротрубочками и промежуточными филаментами. Однако в отличие от других цитоскелетных компонентов септины изучены гораздо слабее. Ранее нами было показано, что удаление септина, кодируемого геном *peanut* (*pnut*), в соматических тканях приводит к аномалиям митоза. Задачей данной работы было выяснение роли *pnut* в сперматогенезе дрозофилы. Нами была получена плазмидная конструкция для РНК-интерференции *pnut*, позволяющая эктопически подавлять экспрессию данного гена. Был исследован сперматогенез при подавлении экспрессии гена *pnut* при помощи РНК-интерференции. Установлено, что чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на самых ранних этапах сперматогенеза: снижение уровня экспрессии данного гена в генеративных клетках семенников на этих стадиях приводило к стерильности самцов, причиной которой является неподвижность спермиев. При этом в семенниках таких стерильных самцов не обнаружено сколь-нибудь значимых нарушений мейоза и последующего морфогенеза, структура аксонемы и митохондрий спермиев нормальная. Также проанализирован сперматогенез у мутантов по различным доменам белка Pnut на фоне нуль-аллеля. Показано, что мутации в ГТФазном домене приводят к нарушениям элонгации цист. У мутантов с делецией С-концевого домена обнаруживаются нарушения в морфологии семенника. Для обоих классов мутантов также показаны неподвижность спермиев и стерильность самцов. Таким образом, выявлено участие Pnut в спермиогенезе – заключительных этапах сперматогенеза, на которых происходит изменение морфологии сперматоцитов.

Ключевые слова: дрозофила; РНК-интерференция; сперматогенез; септины; *peanut*; Pnut.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ахметова К.А., Дорогова Н.В., Болоболова Е.У., Чесноков И.Н., Федорова С.А. Роль белка Pnut и его функциональных доменов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):65-71. DOI 10.18699/VJ16.104

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Akhmetova K.A., Dorogova N.D., Bolobolova E.U., Chesnokov I.N., Fedorova S.A. The role of Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):65-71. DOI 10.18699/VJ16.104

ORIGINAL ARTICLE

Received 06.07.2015 г.

Accepted for publication 17.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

The role of Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis

K.A. Akhmetova^{1,2}, N.D. Dorogova¹, E.U. Bolobolova¹, I.N. Chesnokov², S.A. Fedorova^{1,3}

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

² University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Drosophila Pnut protein belongs to the family of septins, conservative GTPases participating in cytokinesis and many more other fundamental cellular processes. Because of their filamentous appearance, membrane association and functions, septins are considered as the fourth component of the cytoskeleton, along with actin, microtubules and intermediate filaments. However, septins are much less studied than the other cytoskeleton elements. We had previously demonstrated that deletion of the *peanut* (*pnut*) gene leads to mitotic abnormalities in somatic cells. The goal of this work was to study the role of *pnut* in *Drosophila* spermatogenesis. We designed a construct for *pnut* RNA interference allowing *pnut* expression to be suppressed ectopically. We analyzed the effect of *pnut* RNA interference on *Drosophila* spermatogenesis. The most sensitive to Pnut depletion were germ line cells at the earliest stages of spermatogenesis: the suppression of *pnut* expression at these stages leads to male sterility as a result of immotile sperm. Testes of those sterile males did not show any significant meiotic defects; axonemes and mitochondria were normal. We also analyzed the effect of mutations in Pnut conservative domains on *Drosophila* spermatogenesis. Mutations in the GTPase domain resulted in cyst elongation defects. Deletions of the C-terminal domain led to abnormal testis morphology. Both GTPase domain and C-terminal domain mutant males were sterile and produced immotile sperm. To summarize, we showed that Pnut participates in spermiogenesis, that is, late stages of spermatogenesis, when major morphological changes in spermatocytes occur.

Key words: *Drosophila*; RNA interference; spermatogenesis; septin; *peanut*; Pnut.

Септины представляют собой группу консервативных ГТФ-связывающих белков, встречающихся у всех эукариот, за исключением высших растений (Сао et al., 2007). Биологическая функция септинов связана с их способностью образовывать друг с другом гетероолигомерные комплексы, которые в свою очередь формируют длинные полимеры (филаменты) (Sirajuddin et al., 2007; McMurragy et al., 2011). Септины участвуют в цитокинезе, установлении и поддержании внутриклеточной полярности, функционировании микротрубочкового и актинового цитоскелета, клеточном движении, везикулярном транспорте, экзоцитозе, нейрогенезе и других процессах (Saarikangas, Barral, 2011; Mostowy, Cossart, 2012). Для септинов характерно наличие консервативного ГТФазного домена, который, как показывают последние исследования, играет важную роль в динамике септиновых структур внутри клетки (Sirajuddin et al., 2009; Zent, Wittinghofer, 2014; Akhmetova et al., 2015). На С-конце септинов в большинстве случаев располагается биспиральный домен, ответственный за белок-белковые взаимодействия. В связи с филаментной организацией и выполняемыми функциями в последние годы септины стали рассматривать как новый компонент цитоскелета (Mostowy, Cossart, 2012).

У дрозофилы известно пять представителей данного семейства, Pnut, Sep1, Sep2, Sep4 и Sep5. Ранее было показано, что септин, кодируемый геном *peanut* (*pnut*), участвует в цитокинезе соматических клеток (Neufeld, Rubin, 1994). Мы показали, что мутации по данному гену, помимо дефектов цитокинеза, также вызывают нарушения сегрегации хромосом, что приводит к аномалиям плоидности в соматических клетках, однако пролиферация генеративных клеток у мутантов остается незатронутой (Ахметова, Федорова, 2011). В данной работе изучено влияние продукта гена *pnut* и его функциональных доменов на сперматогенез дрозофилы.

Материалы и методы

В работе использовали линию *Drosophila melanogaster* дикого типа *Hikone AW* из фонда сектора генетики клеточного цикла ИЦиГ СО РАН. Линия *w;T4+/CyO;bam-Gal4/VP16* была любезно предоставлена П.П. Лактионовым из ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Остальные линии были получены из стокового центра Блумингтон (Bloomington *Drosophila* Stock Center), США: № 5687: *pnut^{XP}/T(2;3)SM6a-TM6B,Tb¹* – нуль-аллель гена *peanut*;
 № 4414: *y¹w*;P{Act5C-GAL4}25FOI/CyO,y⁺* – повсеместный драйвер *Actin5C-GAL4*;
 № 5138: *yw*;P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3,Sb¹Ser¹* – повсеместный драйвер *tubulin-GAL4*;
 № 4937: *w¹¹¹⁸;P{GAL4::VP16-nos.UTR}CG6325^{MVD1}* – драйвер *nanos-GAL4*, специфический для генеративных клеток;
 № 13134: *w¹¹¹⁸;P{GTI}chif^{BG02820a}/CyO* – драйвер *chif-GAL4*.

Линии, экспрессирующие полноразмерную копию гена *pnut* дикого типа, а также мутантные формы гена (табл. 1) были любезно предоставлены д-р Чесноковым (г. Бирмингем, США) и описаны в статье Ахметовой с коллегами (Akhmetova et al., 2015). Все конструкторы встроены под

1,7 кб 5' UTR *pnut* (предполагаемый промотор) и содержат FLAG-эпитоп на 5'-конце. Наличие экспрессии Pnut было проверено для всех линий при помощи Вестерн-блота с использованием антител на Pnut и FLAG-эпитоп.

Получение плазмидной конструкции и трансгенной линии мух для проведения РНК-интерференции гена *pnut* описано ранее (Ахметова и др., 2015).

Препараты для иммуногистохимического окрашивания и электронно-микроскопического анализа готовили по Pertceva et al. (2010). В работе использовали первичные антитела: rabbit anti-Pnut (1 : 1000) (Huijbregts et al., 2009); вторичные антитела: goat anti-rabbit Alexa 488 fluor (Molecular Probes®, США, 1 : 1000). Микроскопический анализ проводили в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопе Axioscope 2 plus (Zeiss). Ультроструктурный анализ проводили на микроскопе TEM Libra120 (Zeiss).

Результаты

Анализ нарушений сперматогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut*

Гомозиготы, несущие нуль-аллель по гену *pnut*, гибнут на стадии куколки, поэтому для изучения функции этого гена в сперматогенезе нами ранее была создана плазмидная конструкция *pUASP-pnut_RNAi* для проведения РНК-интерференции гена *pnut* и получены соответствующие трансгенные линии дрозофилы (Ахметова и др., 2015). Для анализа экспрессии гена *pnut* в норме и при подавлении экспрессии данного гена при помощи созданной нами РНК-интерференционной плазмиды использовали метод вестерн-блоттинга с применением антител на белок Pnut, а также антител на β -тубулин для контроля загрузки. На рис. 1 показано, что при запуске при помощи повсеместного драйвера *tubulin-Gal4* РНК-интерференция *pnut* приводила к снижению количества продукта гена в семенниках, тогда как количество контрольного белка (β -тубулин) оставалось неизменным. Таким образом, созданная нами плазмидная конструкция является функциональной.

Был проведен цитологический и морфологический анализ сперматогенеза дрозофилы в норме и при подавлении экспрессии, запускаемой повсеместными драйверами *Actin5C-GAL4*, *tubulin-GAL4*, а также специфическими для генеративных клеток драйверами *nanos-GAL4* и *bam-GAL4*. При подавлении экспрессии драйверами *Actin5C-GAL4*, *tubulin-GAL4* и *nanos-GAL4*, экспрессирующимися на всех стадиях сперматогенеза, включая самые ранние, наблюдали идентичный эффект: примерно в 60 % семенных пузырьков сперматозоиды были неподвижны (табл. 2). Подавление экспрессии на стадии предмейотических сперматоцитов, когда происходит основное запасание РНК для спермиогенеза (драйверы *bam-GAL4*, *chif-GAL4*), не приводило к нарушению подвижности спермиев. Таким образом, чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на самых ранних этапах сперматогенеза, однако эффект снижения экспрессии *pnut* проявляется на поздних стадиях, в ходе спермиогенеза, выражаясь в неподвижности спермиев.

Table 1. Transgenic *Drosophila* strains used in this study

Strain	Description
<i>FLAG-pnutWT</i>	Full-length Pnut (amino acids 1–539)
<i>FLAG-pnut(1–427)</i>	Truncated Pnut (amino acids 1–427)
<i>FLAG-pnut(1–460)</i>	Truncated Pnut (amino acids 1–460)
<i>FLAG-pnut(G4)</i>	Pnut with a mutation in the G4 motif of the GTPase domain
<i>FLAG-pnut(G1, G3, G4)</i>	Pnut with mutations in the G1, G3 и G4 motifs of the GTPase domain

Цитологические аномалии сперматогенеза при проведении РНК-интерференции *pnut* встречались с низкой частотой и не могли быть причиной стерильности спермиев. Чтобы выяснить причины неподвижности спермиев при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut*, был проведен электронно-микроскопический анализ семенников, выделенных из стерильных самцов. Для подвижности сперматозоида наиболее важны аксонема, митохондрии и базальное тело. Мы показали, что структура аксонемы и митохондрий у мутантов не отличалась от нормы. Однако структура базального тела у мутантов и дикого типа отличалась. Базальное тело представляет собой модифицированную центриоль, которая располагается в основании аксонемы и необходима для ее сборки. В ходе элонгации сперматиды вокруг базального тела в виде воротничка формируется электронно-плотная структура, называемая центриолярным придатком (centriolar adjunct). Он напоминает перичентриолярный материал центросом, однако функции этой структуры до сих пор не выяснены. На рис. 2 видно, что центриолярный придаток у мутантов имеет больше лопастей (похож на фейерверк), причем его реструктуризация к более поздним стадиям развития сперматиды (в норме он постепенно принимает округлую форму и вакуолизируется) запаздывает. На стадиях спермиогенеза, когда ядро имеет вытянутую форму, у мутантов по гену *pnut* центриолярный придаток продолжает быть вытянутым (рис. 2, б).

Изучение роли функциональных доменов Pnut

РНК-интерференция подавляет экспрессию гена, но не позволяет получить данные о функциональных доменах продукта данного гена. Для выявления вклада различных доменов Pnut использовали мутантов по консервативным мотивам и участкам белка (рис. 3). В работе исследовали одиночную мутацию в консервативном мотиве G4 ГТФазного домена белка Pnut(G4), а также тройной мутант *Pnut(G1, G3, G4)*, при этом консервативные аминокислоты были заменены на аланины. Кроме того, анализировали делеционные формы белка Pnut, Pnut(1–427) и Pnut(1–460), с нарушенным С-концевым доменом.

Ранее было показано, что экспрессия трансгена *FLAG-pnutWT*, несущего копию гена *pnut* дикого типа, восстанавливает жизнеспособность нуль-аллеля *pnut^{XP}*, летального в третьем личиночном возрасте. Введение трансгенов *FLAG-pnut(1–427)* или *FLAG-pnut(1–460)*, содержащих делецию С-концевого участка белка, а также трансгенных копий гена *pnut*, (*FLAG-pnut(G4)* и *FLAG-pnut(G1, G3, G4)*), мутантных по ГТФазному домену, не

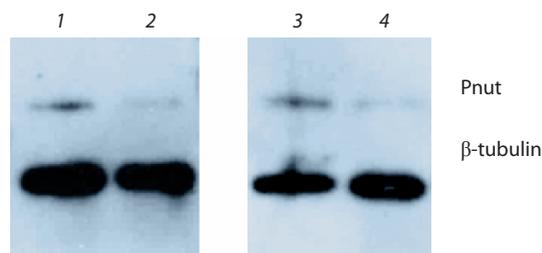


Fig. 1. Test of *pnut* expression level in *pnut* RNA interference.

Western blots of testis extracts are shown. The Pnut protein was detected with anti-Pnut antibodies (Huijbregts et al., 2009). Antibodies against β -tubulin (E7, DSHB) were used as a loading control. Lanes: 1, control: *tubulin-GAI4/Sb*; 2, *pUASP-W-pnut_RNAi/tubulin-GAI4*; 3, control: *pUASP-W-pnut_RNAi/Sb*; 4, *pUASP-W-pnut_RNAi/tubulin-GAI4*.

спасало делецию *pnut^{XP}* до стадии имаго (Akhmetova et al., 2015). Описанные эксперименты по спасению фенотипа летальной мутации *pnut^{XP}* проводили непосредственно после первой балансировки только что полученных трансгенных встроок, и спасения для мутантных форм Pnut обнаружено не было. Были получены трансгенные линии вида *pnut^{XP}/Cy;FLAG-pnut*. Через несколько поколений, в результате стабилизации генетического фона, в полученных линиях, которые в первоначальном эксперименте (Akhmetova et al., 2015) не удалось спасти, стало появляться незначительное количество мух, доживающих до стадии поздней куколки и даже имаго, но с сильно ослабленной жизнеспособностью. Это позволило нам изучить эффект данных мутаций на процесс сперматогенеза дрозофилы.

С использованием антител на Pnut была исследована локализация белка Pnut в мутантных семенниках. В норме, а также при спасении нуль-аллеля *pnut^{XP}* трансгеном дикого типа *FLAG-pnutWT* Pnut локализуется кортикально, формируя пунктирный паттерн (рис. 4, а). Обе укороченные формы Pnut с делецией С-концевого домена имели тенденцию формировать «агрегаты», которые не обнаруживали характерного паттерна локализации, как показано на примере *FLAG-pnut(1–427)* (рис. 4, б). Мутации в ГТФазном домене Pnut также нарушали правильную локализацию белка, при этом специфическая пунктирная мембранная окраска отсутствовала и обнаруживалась диффузная окраска по всей цитоплазме клеток семенников (рис. 4, в, а также Akhmetova et al., 2015). Таким образом, можно заключить, что как С-концевой, так и ГТФазный

Table 2. Test of sperm motility at 24 °C

Genotype	Total males analyzed	Sperm		
		motile	immotile	partially motile, comments
<i>nanos-GAL4/pnut-RNAi</i>	46	17	5	24; one seminal vesicle with motile sperm, one with immotile sperm
<i>bam-GAL4/pnut-RNAi</i>	13	10	1	2; one seminal vesicle with motile sperm, one with immotile sperm
<i>chif-GAL4/pnut-RNAi</i>	10	8	1	1; one seminal vesicle with motile sperm, one with immotile sperm
<i>Actin5C-GAL4/pnut-RNAi</i>	30	12	–	8; one seminal vesicle with motile sperm, one with immotile sperm 10; partially motile sperm
<i>tubulin-GAL4/pnut-RNAi</i>	22	8	2	12; one seminal vesicle with motile sperm, one with immotile sperm
<i>pnut^{XP};FLAG-pnut(1–427)</i>	24	4	7	13; test impossible, as seminal vesicles do not contact with testes
<i>pnut^{XP};FLAG-pnut(G1, G3, G4)</i>	9	2	7	0

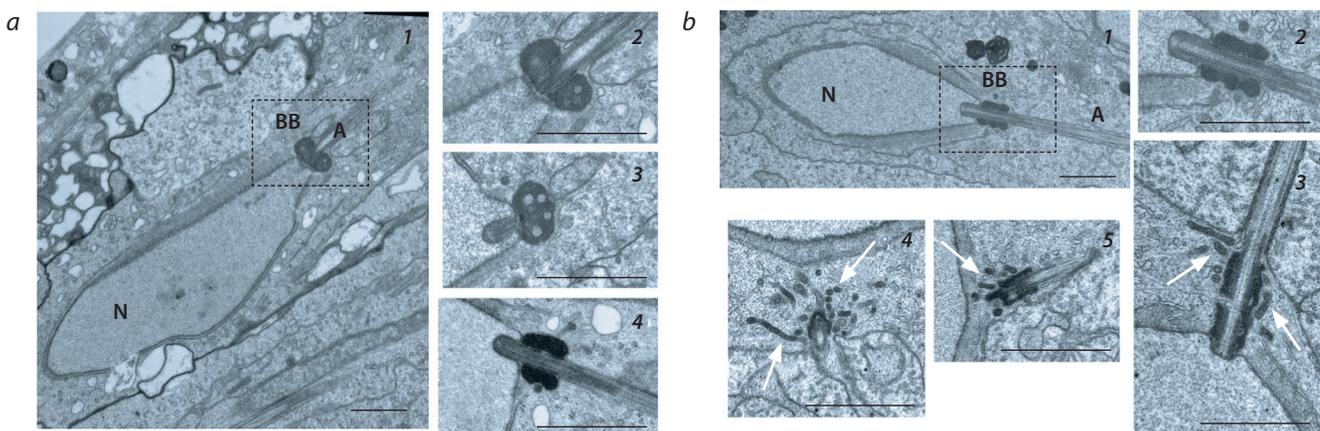


Fig. 2. Electron microscopic examination (EM) of spermatid basal body.

(a) EM of wild type spermatid sections. BB, basal body; A, axoneme; N, nucleus. 1, 2, section longitudinal to the nucleus (N), slightly at a tangent to axoneme (2 shows the enlarged dashed area of 1); 3, section at a tangent to axoneme, spermatid stage is earlier than in 1–3. Centriolar adjunct surrounding the basal body is rounded, with vacuoles inside. As the spermatid differentiates, the centriolar adjunct becomes more rounded. (b) EM of *nanos-GAL4/pnut-RNAi* spermatids. 1–3, sections longitudinal to the axoneme; 4, section transverse to the axoneme; 5, section at a tangent to axoneme. The centriolar adjunct is highly elongated, uneven, and surrounded by numerous fragments (indicated with arrows). Scale bar 1 μ m.

домены важны для правильной локализации белка *in vivo* в семенниках дрозофилы.

Генетические тесты на стерильность показали, что самцы *pnut^{XP}*, экспрессирующие трансгены с С-концевой делецией *FLAG-pnut(1–427)*, а также ГТФазный мутант *FLAG-pnut(G1, G3, G4)* имели аналогичный фенотип неподвижных спермиев, как и при проведении РНК-интерференции *pnut* (табл. 2). Нарушения цитокинеза в мейозе наблюдались с невысокой частотой в обеих линиях. Однако ни в одном случае эти нарушения не были критичны и не могли приводить к стерильности.

В сперматогенезе делеционных мутантов *pnut^{XP};FLAG-pnut(1–427)*, а также *FLAG-pnut(1–460)*, помимо непод-

вижных спермиев, ярким нарушением была форма семенников, которые в 70–80 % случаев были недоразвиты и выглядели как личиночные, при этом они не контактировали с семенными пузырьками (рис. 5). Однако в этих шаро- и грибообразных семенниках шли все процессы, характерные для сперматогенеза: генеративные клетки делились, вступали в мейоз, после чего начинался спермиогенез, завершающийся образованием нормальных на вид сперматозоидов, которые никуда затем не двигались. Подвижность этих сперматозоидов оценить не удалось, так как для анализа подвижности используется сперма из семенного пузырька, а в случае мутантов он часто был пустым из-за отсутствия контакта с остальной частью

семенника. В сперматогенезе этих мутантов встречаются также нарушения цитокинеза, но они не являются существенными и значимыми для фертильности.

В сперматогенезе у тройного ГТФазного мутанта *pnut^{XP};FLAG-pnut(G1, G3, G4)* также проявляются нарушения цитокинеза, однако они не критичны. Самые значительные нарушения происходили на пост-мейотических стадиях во время элонгации сперматид. У мутантов часто была нарушена элонгация и/или поляризация цист, что приводило к формированию цист с хаотично разбросанными ядрами.

Обсуждение

Запуская РНК-интерференцию гена *pnut* с помощью драйвера *nanos-GAL4*, специфичного к клеткам зародышевого пути, мы обнаружили высокий процент стерильных самцов. Цитологический анализ сперматогенеза показал, что при снижении уровня экспрессии *pnut* около 60 % спермиев были неподвижны. При использовании других драйверов было также выявлено, что чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на ранних этапах сперматогенеза, возможно, затронуты первые митотические деления. Однако эффект снижения экспрессии гена *pnut* проявляется гораздо позже, в спермиогенезе, и выражается в неподвижности спермиев.

Аналогичные исследования проводились на млекопитающих. Было показано, что у млекопитающих белки SEPT4 и SEPT7 (гомолог Pnut) необходимы для формирования особой кольцеподобной мембранной структуры – аннулуса, которая разделяет хвост на различающиеся компартменты. У нокаутных по *SEPT4* мышей наблюдались аномальное формирование или отсутствие аннулуса, нарушение ультраструктурной организации митохондрий, приводящие к неподвижности спермиев и стерильности (Kissel et al., 2005; Lhuillier et al., 2009). Однако в сперматозоидах дрозофилы структуры, подобной аннулусу, не наблюдается. Более того, мы обнаружили, что при подавлении экспрессии *pnut* у дрозофилы ультраструктура митохондрий и аксономы

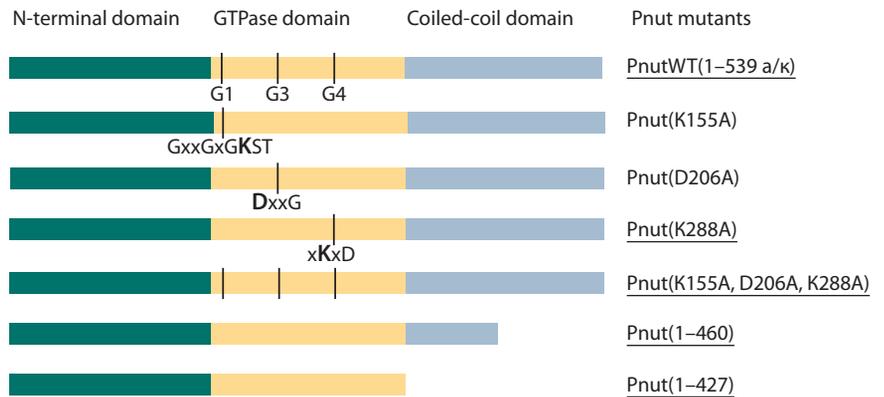


Fig. 3. The domain structure of the Pnut protein.

Left: schematic representation of the Pnut domain structure. Right: mutations in conservative domains. Conservative amino acids in the G1, G3, and G4 motifs of the GTPase domain (shown in bold) are replaced by alanine residues. Mutants used in this study are underlined.

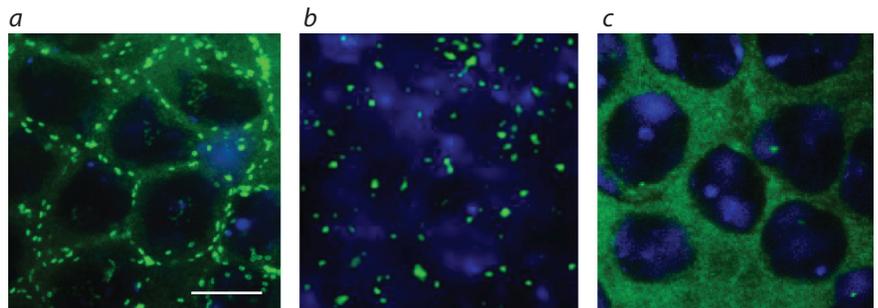


Fig. 4. Mutations in Pnut functional domains affect protein localization *in vivo*: (a) Cortical Pnut localization in wild type testes stained with antibodies against Pnut. (b) Abnormal Pnut protein localization and distribution in mutants with a C-terminal deletion in Pnut (*pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)*). (c) Diffuse Pnut localization in GTPase domain mutants (*pnut^{XP};FLAG-pnut(G4)*). Green coloration shows Pnut; blue, DAPI. Scale bar 10 μm.

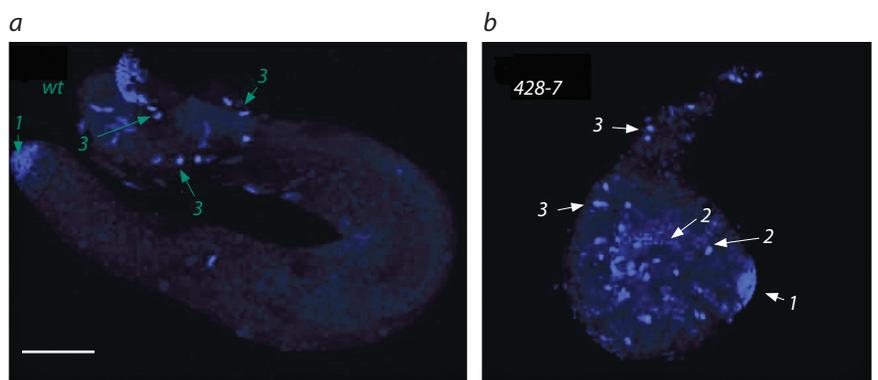


Fig. 5. Spermatogenesis aberrations in Pnut C-terminal deletion mutants: (a) Wild-type imago testes. (b) Testes of *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)* mutant imago males have a round shape and do not contact with seminal vesicles.

Arrows: (1) mitotic divisions of germ line cells; (2) meiosis; (3) spermiogenesis, ending in spermatozoon formation. DNA is stained with DAPI. Scale bar 100 μm.

(основных компонентов, отвечающих за подвижность спермиев) оставалась интактной. Помимо митохондрий и аксонемы, в обеспечении подвижности сперматозоида принимает участие базальное тело, которое представляет собой модифицированную центриоль. После мейоза каждая гаплоидная сперматид содержит одно базальное тело с короткой аксонемой. По мере продвижения к ядру оно ассоциирует с плазматическими микротрубочками (МТ). После ассоциации с мембраной ядра базальное тело служит МТ-организующим центром, участвуя в сборке как аксонемы хвоста сперматозоида, так и перинуклеарных МТ. Правильный докинг и сохранение ассоциации базального тела с ядерной оболочкой критичны для формирования подвижной спермы у дрозофилы. В ходе дифференциации сперматиды, когда базальное тело уже достигло ядра, оно на некоторое время становится окруженным электронно-плотной структурой, называемой центриолярным придатком (centriolar adjunct), которая напоминает перичентриолярный материал центросом. Центриолярный придаток представляет собой очень динамичную структуру, которая по мере удлинения ядра сокращается и принимает форму круглого воротничка, а затем исчезает. Мы обнаружили, что центриолярный придаток в семенниках самцов с РНК-интерференцией гена *pnut* имеет дефекты в морфологии, кроме того, запаздывает его реструктуризация к более поздним стадиям сперматогенеза. Как дефекты в этой структуре связаны с неподвижностью спермы, пока не ясно. Возможно, что наблюдаемые нами дефекты в центриолярном придатке на самом деле отражают аномалии базального тела, которое непосредственно принимает участие в обеспечении подвижности сперматозоида.

Интересным фенотипом обладают мутанты с С-концевой делецией Pnut. Семенники у таких самцов недоразвиты и имеют шаро- или грибообразную форму, напоминая личиночные семенники, и при этом не контактируют с семенными пузырьками. В литературе есть много сведений о взаимодействии соматических клеток ниши с генеративными, подробно изучено распределение морфогенов и слоев в генитальных дисках, но нет ничего о том, как эти составные части семенника состыковываются в позднем эмбриогенезе или на стадии ранней личинки. Скорее всего, для этого нужны клеточные контакты и сигнальные молекулы. Мы полагаем, что в данных процессах могут участвовать белки кадгерини. С-концевой домен Pnut содержит биспиральный участок, вовлеченный во взаимодействие с другими белками, поэтому нарушение локализации Pnut может приводить к неправильной локализации белков-партнеров данного септина. Поскольку Pnut в клетках семенников располагается кортикально, белками-партнерами могут быть различные компоненты клеточных контактов, а также рецепторы.

У мутантов по ГТФазному домену Pnut нарушена поляризация цисты. Изначально циста, состоящая из 64 круглых гаплоидных сперматид, не поляризована. Однако к ранним стадиям элонгации кольцевые каналы группируются возле актин-богатых областей кортикальной мембраны на дистальном (растущем) конце элонгирующих сперматид, т. е. происходит поляризация цисты. Мы полагаем, что Pnut участвует в поляризации

цист в сперматогенезе за счет изменения уровня фосфолипидов. Микроскопические исследования в реальном времени сперматид, культивируемых *in vitro*, показали, что для правильной своевременной поляризации требуется нормальный уровень фосфолипида фосфатидилинозитол 4,5-дифосфата (PIP2) на плазматической мембране (Fabian et al., 2010). Снижение мембран-связанного PIP2 за счет экспрессии белка SigD, являющегося фосфатазой PIP2, приводило к значительным дефектам поляризации цист. Для большинства септинов было показано взаимодействие с фосфолипидами мембран (Casamayor, Snyder, 2003). Также было показано, что септиновый комплекс человека SEPT2-SEPT6-SEPT7 способен модифицировать морфологию гигантских липосом, содержащих фосфоинозитиды (Tanaka-Takiguchi et al., 2009). Предложенную нами гипотезу подтверждает тот факт, что у мутанта по ГТФазному домену Pnut отсутствуют специфические пунтирные структуры в кортикальной области. Возможно, такие мутантные формы белка не способны взаимодействовать с мембраной и, как следствие, не могут участвовать в процессах модификации уровня фосфолипидов.

Таким образом, показано участие Pnut в спермиогенезе – заключительных этапах сперматогенеза, на которых происходит изменение морфологии сперматоцитов. Характерной особенностью мутантов по Pnut является стерильность, вызванная неподвижностью спермы. На основе данных электронной микроскопии мы полагаем, что у мутантов нарушено функционирование базального тела. Другие аномалии сперматогенеза, обнаруженные у мутантов по консервативным доменам Pnut, указывают на многофункциональность белка в процессах сперматогенеза, в частности на его участие в клеточном сигналинге, а также в поляризации цист.

Acknowledgments

This work was supported by ОПТЕК, project 41/2014/51- Nvs “The role of septin Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis”; the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-31289-mol_a; and State Contract 0324-2015-0003.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akhmetova K., Balasov M., Huijbregts R.P.H., Chesnokov I. Functional insight into the role of Orc6 in septin complex filament formation in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell.* 2015;26(1):15-28. DOI 10.1091/mbc.E14-02-0734
- Akhmetova K.A., Dorogova N.D., Chesnokov I.N., Fedorova S.A. The effect of peanut gene RNAi on *Drosophila* oogenesis. *Genetika=Genetics (Moscow)*. 2015;51(9). (in print)
- Akhmetova K.A., Fedorova S.A. Effect of mutations in the peanut gene on somatic and germ line cell division in *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(4):653-660.
- Cao L., Ding X., Yu W., Yang X., Shen S., Yu L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Lett.* 2007;581:5526-5532. DOI 10.1016/j.febslet.2007.10.032
- Casamayor A., Snyder M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and

- function. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(8):2762-2777. DOI 10.1128/MCB.23.8.2762-2777.2003
- Fabian L., Wei H.C., Rollins J., Noguchi T., Blankenship J.T., Belamkonda K., Polevoy G., Gervais L., Guichet A., Fuller M.T., Brill J.A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate directs spermatid cell polarity and exocyst localization in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell.* 2010;21(9):1546-1555. DOI 10.1091/mbc.E09-07-0582
- Huijbregts R.P., Svitin A., Stinnett M.W., Renfrow M.B., Chesnokov I. *Drosophila* Orc6 facilitates GTPase activity and filament formation of the septin complex. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20:270-281. DOI 10.1091/mbc.E08-07-0754
- Kissel H., Georgescu M.M., Larisch S., Manova K., Hunnicutt G.R., Steller H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev. Cell.* 2005;8:353-364. DOI 10.1016/j.devcel.2005.01.021
- Lhuillier P., Rode B., Escalier D., Lorès P., Dirami T., Bienvenu T., Gacon G., Dulioust E., Touré A. Absence of annulus in human asthenozoospermia: Case Report. *Hum. Reprod.* 2009;24(6):1296-1303. DOI 10.1093/humrep/dep020
- McMurray M.A., Bertin A., Garcia G., Lam L., Nogales E., Thorner J. Septin filament formation is essential in budding yeast. *Dev. Cell.* 2011;20(4):540-549. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.02.004>
- Mostowy S., Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(3):183-194. DOI 10.1038/nrm3284
- Neufeld T.P., Rubin G.M. The *Drosophila peanut* gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell.* 1994;77:371-379. DOI 10.1016/0092-8674(94)90152-X
- Pertceva J.A., Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Nerusheva O.O., Fedorova S.A., Omelyanchuk L.V. The role of *Drosophila hyperplastic discs* gene in spermatogenesis. *Cell Biol. Int.* 2010;10:991-996. DOI 10.1042/CBI20100105
- Saarikangas J., Barral Y. The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Rep.* 2011;12(11):1118-1126. DOI 10.1038/embor.2011.193
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F., Kühlmann D., Macara I.G., Weyand M., Stark H., Wittinghofer A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature.* 2007;449:311-315. DOI 10.1038/nature06052
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Zent E., Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(39):16592-16597. DOI 10.1073/pnas.0902858106
- Tanaka-Takiguchi Y., Kinoshita M., Takiguchi K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol.* 2009;19(2):140-145. DOI 10.1016/j.cub.2008.12.030
- Zent E., Wittinghofer A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biol. Chem.* 2014;395:169-180. DOI 10.1515/hsz-2013-0268

Оценка мутагенности химических соединений, физических факторов и неидентифицированных компонентов загрязнения окружающей среды методом соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster*

А.П. Захаренко^{1,2}, И.К. Захаров^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В статье описан соматический мутационный и рекомбинационный тест (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART) на клетках крыла *Drosophila melanogaster*, который может быть использован для оценки влияния на геном различных факторов: физических (температура, разные типы радиоактивного излучения, электромагнитные поля), биогенных (генетические, физиологические, инфекционные) и широкого спектра химических соединений. Метод SMART используется как вариант метода *in vivo* при оценке мутагенных и промутагенных свойств пищевых добавок и продуктов, при скрининге потенциальных лекарственных и косметических препаратов, поллютантов окружающей среды. В основе метода лежит действие изучаемого агента на геном активно делящихся клеток крылового имагинального диска личинки, гетерозиготной по рецессивным мутациям, маркирующим клетку крыла. Мутации локализованы на левом плече хромосомы 3 – *multi wing hairs* (*mwh*; 3 – 0,3) и *fla e* (*fl* ; 3 – 38,8), что позволяет выявлять у гетерозигот по этим локусам как мутационные, так и рекомбинационные события. Крыло *Drosophila melanogaster* содержит 24 400 клеток, расположенных в два слоя, и в норме каждая клетка крыла имеет одну ворсинку. Рекомбинационное или мутационное событие в клетке приводит к образованию мутантных пятен / клонов, видимых при микроскопическом анализе поверхности крыловой пластинки. Наряду с тем, что в основе системы детоксикации дрозофилы и млекопитающих лежит действие цитохрома P450, к достоинствам метода SMART относится существование модификаций теста с повышенным уровнем экспрессии цитохрома P450, позволяющих более надежно экстраполировать результаты тестирования на млекопитающих. Подробные рекомендации по использованию метода SMART на клетках крыла *Drosophila melanogaster*, представленные в работе, могут применяться как методическое пособие в практике и учебных целях.

Ключевые слова: SMART; *mwh*; *fl* ; соматический мутагенез; *Drosophila melanogaster*.

Determination of mutagenicity of chemical compounds, physical factors and environmental pollutants by the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test

L.P. Zakharenko^{1,2}, I.K. Zakharov^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

A somatic mutation and recombination test (SMART) on the wing cells of *Drosophila melanogaster* is described in this article in detail. SMART can be used to evaluate the effect of various factors on the genome: physical (temperature, various types of radiation, electromagnetic fields), biogenic (genetic, physiological, infectious factors) and a wide range of chemical compounds. SMART is used as an *in vivo* version of the method for evaluating promutagenic and mutagenic properties of food, food supplements, potential drugs and cosmetics, and environmental pollutants. The method is based on the influence of the agents under study on the dividing cells of the wing imaginal discs of larvae heterozygous for recessive mutations, marking the wing cells. The mutations, *multi wing hairs* (*mwh*; 3 – 0.3) and *fla e* (*fl* ; 3 – 38.8), are located on the left arm of chromosome 3. The *Drosophila melanogaster* wing contains 24,400 cells arranged in two layers. Each normal cell has only one wing fiber. Recombination or mutational events in the cell leads to the formation of mutant spots/clones visible by microscopic analysis of the wing surface. The *Drosophila* and mammalian detoxication system is arranged on similar principles, which are based on the action of cytochrome P450. There are modifications to SMART, based on elevated cytochrome P450 expression, allowing more reliable extrapolation of the test results to mammals. Detailed

recommendations for the use of the SMART method on the wing cells of *Drosophila melanogaster* presented in the paper can be used as a textbook in practice and for training purposes.

Key words: SMART; *mwh*; *fl*; somatic mutagenesis; *Drosophila melanogaster*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Захаренко Л.П., Захаров И.К. Оценка мутагенности химических соединений, физических факторов и неидентифицированных компонентов загрязнения окружающей среды методом соматических мозаиков на клетках крыла *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):72-77. DOI 10.18699/VJ16.113

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zakharenko L.P., Zakharov I.K. Determination of mutagenicity of chemical compounds, physical factors and environmental pollutants by the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):72-77. DOI 10.18699/VJ16.113

D*rosophila melanogaster* на протяжении более века является излюбленным генетическим объектом исследований, одним из основных модельных объектов в экспериментальной биологии на всех уровнях организации живого – от молекулярного и клеточного до организменного и популяционного (Медведев, 1966; *Drosophila* ..., 1986; Ashburner, 1989; Rubin, Lewis, 2000; Wolf, Heberlein, 2003; Юрченко и др., 2005; Arias, 2008; Greenspan, 2008; Bellen et al., 2010).

Дрозофила эффективно используется для оценки токсических, мутагенных, канцерогенных и протекторных свойств широкого спектра химических соединений и физических факторов, при скрининге лекарственных средств и установлении молекулярных механизмов их действия (*Drosophila* ..., 1986; Zijlstra et al., 1987; Vidal, Cagan, 2006; Pandey, Nichols, 2011). Моделирование заболеваний человека на *D. melanogaster* связано с высокой степенью сходства консервативных генов, физиологических процессов и общности путей реализаций развития признаков, а также с досконально изученной генетикой самого объекта. Немаловажно, что для дрозофилы свойственны быстрая смена поколений, большое количество потомков, получаемых от пары родителей, а также сравнительная дешевизна экспериментальной работы по сравнению с моделями *in vivo* на млекопитающих.

В силу неизбежной видовой специфичности систем детоксикации и метаболизма химических соединений не существует идеальных тест-систем, однозначно оценивающих токсичность, мутагенность, канцерогенность и другие свойства химических соединений и физических факторов.

Из мирового опыта следует, что набор из трех различных генетических тест-систем достаточен, для того чтобы сделать достоверное заключение о мутагенности тестируемого химического соединения. В обычно используемый набор генетических методов входят: микробиологический тест; тест с использованием культуры клеток млекопитающих *in vitro*; и, по крайней мере, один тест предполагает использование системы *in vivo*, когда генетический эксперимент проводится на организменном уровне, поскольку нельзя исключить, что тестируемое химическое соединение промутаген в процессе метаболизма не приобретет мутагенные свойства. Для оценки промутагенных свойств обычно используют лабораторных животных – грызунов или дрозофилу. Заключение о мутагенности будет более достоверным, по нашему мнению, если в системе *in vivo*

будет использоваться дрозофила. Это связано, с одной стороны, с тем, что ситуация *in vivo* на млекопитающих моделируется в современных вариантах микробиологических тестов, поскольку существуют модификации этих тестов с метаболической активацией химических соединений микросомальной фракцией печени крыс и мышей. С другой стороны, показано, что система детоксикации химических соединений у насекомых, в частности у дрозофилы, устроена по тому же принципу, что и у человека, и у других млекопитающих, и в ее основе лежит активность системы цитохрома P-450 (Wilkinson, Brattsten, 1972). Система цитохрома P-450 у дрозофилы индуцибельна и содержит несколько изоферментных форм (Zijlstra et al., 1987). Благодаря этому организм дрозофилы способен активировать широкий спектр промутагенов (Frölich, Würgler, 1989; Graf et al., 1984, 1989; Graf, Singer, 1992).

Классическим методом для количественной оценки мутагенности химических соединений на дрозофиле является тест сцепленных с полом рецессивных мутаций, принципиальная схема которого была предложена еще Г. Меллером более полувека назад и до сих пор не претерпела изменений. С 1974 г. стали использовать для оценки мутагенности соматические клетки дрозофилы, а именно глазные имагинальные диски (Mollet, Würgler, 1974). К несомненным преимуществам тест-систем *in vivo* на соматических клетках дрозофилы следует отнести наряду с быстрой сменой поколений возможность работы с большими выборками (надежность статистических заключений), что значимо в генетических экспериментах.

Позднее в связи с тем, что была обнаружена корреляция между мутагенными и канцерогенными свойствами химических соединений (Vogel et al., 1980) и канцерогенез оказался связанным не только с мутагенной, но и с рекомбиногенной активностью химических соединений (Kinsella, Radman, 1978; Radman, Kinsella, 1980), был разработан метод соматических мозаиков – Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) (Lawrence et al., 1986), и интерес к соматическим мутациям возрос. На клетках крыла *D. melanogaster* SMART оказался наиболее удобным для практического применения и продолжает широко использоваться (Graf et al., 1989; Krogulski, 1994; Lombardot et al., 2015).

Мы увеличили чувствительность метода SMART на клетках крыла *D. melanogaster*, что важно из-за низкой частоты генетических событий, введя в анализ класс оди-

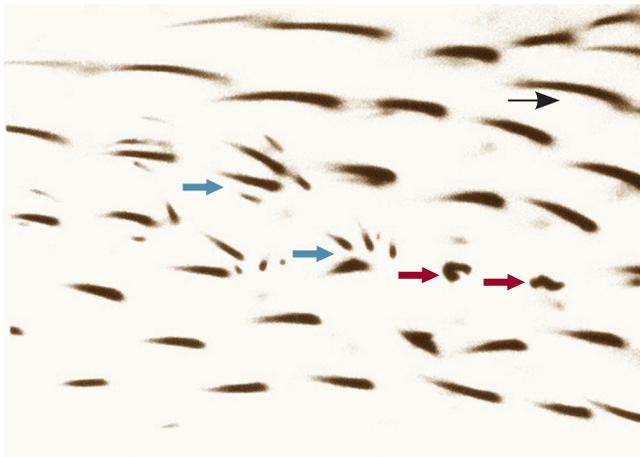


Fig. 1. The twin mutant spot as a result of a recombination event. \blackrightarrow , the normal cell; \bluearrow , the "multi wing hairs" (*mwh*) mutation; \redarrow , the "fla e" (*fl*) mutation.

ночных мутаций, имеющих морфологическое проявление (Захаренко, Захаров, 1996; Захаренко и др., 1997), которое авторы, разработавшие метод, относят к модификациям. В данной работе приведено детальное описание, «шаг за шагом», метода соматических мозаиков на клетках крыла *D. melanogaster*.

Линии *Drosophila melanogaster*, используемые в тест-системе SMART на клетках крыла

В тесте используются линии *D. melanogaster*, несущие рецессивные мутации, локализованные на левом плече хромосомы 3 – *multi wing hairs* (*mwh*; 3–0,3) и *flare* (*flr*; 3–38,8) (Lindsley, Zimm, 1992). Мутация *flr*³ в гомозиготном состоянии летальна, поэтому хромосому с данной мутацией поддерживают в гетерозиготном состоянии с балансерной хромосомой TM3 (маркирована мутацией *Ser*). В результате скрещивания самок *mwh* с самцами *flr*³/*Ser* получают потомков двух генотипов: *mwh/flr*³ (нормальная форма крыла) и *mwh/Ser* (крылья с вырезкой). Для микроскопического анализа берут крылья нормальной формы. Когда необходимо оценить долю рекомбинантов среди общего числа мутаций, анализируют крылья с вырезкой, так как у таких особей соматическая рекомбинация в хромосоме 3 супрессирована за счет балансерной хромосомы TM3.

В 1982 г. А. Frölich и F. Würgler предложили использовать в тест-системе на клетках крыла дрозофилы улучшенную линию *ORR flr*³, которая отличается от исходной тем, что хромосомы 1 и 2 линии *flr*³ были замещены на хромосомы 1 и 2 линии Oregon-R, устойчивой к инсектициду ДДТ (трихлорметилди(*n*-хлорфенил)метан). Ген *R1*, локализованный на второй хромосоме, обеспечивает устойчивость к ДДТ и ответственный за высокий уровень экспрессии цитохрома P-450 (Frölich, Würgler, 1989). Благодаря этому чувствительность метода повышается в 2,5 раза для некоторых химических соединений и метод позволяет выявлять мутагены и промутагены с большей

эффективностью. В 1992 г. U. Graf и N. Shaik показали, что если скрещивать самок линии *ORR flr*³ с самцами линии *mwh* (*ORR* в гетерозиготном состоянии), то эффективность метода так же высока, как и в случае скрещивания самок *ORR flr*³ с самцами *ORR mwh* (*ORR* – в гомозиготном состоянии), но в первом случае вероятность ошибок при анализе мутаций меньше, чем во втором. Ошибки возможны, когда *ORR*-хромосома 2 находится в гомозиготном состоянии, при этом проявляется рецессивная мутация, вызывающая деформацию формы ворсинок и сцепленная с геном *R1* (Graf, van Schaik, 1992).

Морфологическое проявление мутаций *mwh* и *flr*

Каждое крыло дрозофилы содержит около 24 400 клеток, расположенных в два слоя. Каждая клетка содержит морфологический маркер – ворсинку. У мутантной мухи, гомозиготной по гену *mwh*, клетка содержит вместо одной несколько ворсинок разной длины. Мутация *flr* проявляется как деформированная ворсинка, имеющая форму языка пламени (рис. 1).

Схема эксперимента

Биологические объекты – системы многофакторные, поэтому в контроле любые количественные показатели могут меняться от эксперимента к эксперименту в силу влияния случайных причин или неконтролируемых факторов. В некоторых случаях такая причина известна. Так, например, повышение температуры содержания личинок с 25 до 29 °С заметно увеличивает частоту соматических мутаций (Graf, 1986; Katz, Foley, 1993), поэтому необходимо максимально стандартизировать условия проведения эксперимента.

Чтобы получить достоверный результат, для каждого типа воздействия (концентрация, температура, стадия и время воздействия) необходимо взять несколько пробирок с кормом, в каждую из которых на сутки помещают равное количество виргинных самок линии *ORR flr*³ и самцов линии *mwh*. Время, в течение которого личинки контактируют с исследуемым веществом, можно варьировать, перенося личинок, находящихся на определенной стадии развития, на корм, содержащий тестируемое вещество. Орган-мишень – имагинальный крыловой диск – имеет следующие размеры: через одни сутки личиночного развития – 30 клеток, на стадии предкуколки – 24 400 клеток (Roberts, 1986). Орган перестает быть чувствительным к воздействию, когда деление клеток в крыловом имагинальном диске прекращается. Чем больше размер ткани-мишени в момент воздействия, тем выше частота мутирования. Чем раньше произойдет мутационное событие (чем меньше количество клеток в имагинальном диске в момент воздействия), тем больше будет размер мутантного пятна (Ashburner, 1989; Graf, 1995). Личинок в опыте можно выращивать на корме с добавлением тестируемого вещества весь период личиночного развития – от яйца до имаго, если мутагенный эффект слабый и нет задачи исследовать силу мутационного воздействия в зависимости от стадии развития и длительности воздействия.

Доза тестируемого на мутагенность химического вещества зависит от его токсичности и не должна превышать

The compositions of the "poor" and "rich" food

Ingredient	"poor" food	"rich" food
Agar-agar, g	10	10
Sugar, g	60	60
Yeast, g	7	40
Semolina, g	–	60
Starch, g	20	–
Water, l.	≤ 1	≤ 1

LD₅₀, вызывающую гибель 50 % личинок. Обычно берут 1/2–1/4 от LD₅₀. Если тестируется нетоксичный или малотоксичный лекарственный препарат, то его концентрация должна превышать терапевтическую дозу на два порядка величин. Рекомендуется брать две–три разные концентрации, так как наличие дозовой зависимости при слабом мутагенном эффекте застрахует результат от возможных случайных ошибок (Оценка мутагенности ..., 1991).

Оценка мутагенности химических веществ

1. Корм, содержащий нужную концентрацию тестируемого на мутагенность вещества, разливают в шесть пробирок по 5–10 мл в каждую и накрывают их марлей, сложенной в два–три слоя. Состав корма указан в таблице. Для поддержания линий *D. melanogaster* используют «бедный» корм, на котором при комнатной температуре развитие идет медленнее, чем на «богатом» корме, поэтому мух можно перебрасывать в свежие пробирки не чаще одного раза в месяц. В эксперименте используют «богатый» дрожжевой корм. Особенности работы с дрозофилой подробно описаны в специальных практических руководствах (Медведев, 1966; Roberts, 1986; Ashburner, 1989; Graf et al., 1992).

2. После того как корм остынет и со стенок пробирок испарится лишняя влага, в пробирки на сутки помещают 15 виргинных самок *ORR flr³* и 10 самцов линии *mwh*. Возраст самок должен быть не менее двух суток, так как более молодые особи не способны эффективно спариваться и откладывать достаточное количество яиц. Максимальной фертильности самки дрозофилы достигают на пятый день после вылупления, мухи старше 10-дневного возраста не используются. Контрольные и опытные эксперименты проводятся одновременно при одинаковых условиях.

3. Имаго, развившихся из подвергнутых воздействию личинок, наркотизируют и разделяют по фенотипу (крылья с вырезкой – *mwh/Ser* и крылья без вырезки – *mwh/flr³*). Для анализа используют крылья мух генотипа *mwh/flr³*, если нет задачи оценить долю рекомбинантов в общем числе мутационных событий. Мух можно хранить несколько месяцев в растворе 70 %-го этанола.

Приготовление препаратов из крыльев мух для микроскопирования

На предметное стекло в каплю дистиллированной воды помещают несколько фиксированных 70 %-м этанолом

мух. Пинцетом с острыми браншами отрывают крыло у самого основания, придерживая муху препаровальной иглой. Отделенное крыло переносят в каплю раствора Фора на другое предметное стекло. В состав раствора Фора входит 6 г гуммиарабика, 4 мл глицерина, 10 г хлоралгидрата и 10 мл воды (Wieshaus, Nusslein-Volhard, 1986). Раствор не должен быть слишком жидким или вязким, а капля – очень большой, чтобы покровное стекло не «плавало» по капле. Раствор не должен выступать из-под покровного стекла, которым накрывают каплю после того, как в нее будет перенесено 10–15 крыльев. Тяжести покровного стекла достаточно, чтобы крыло хорошо расправилось. Придавливать покровное стекло не рекомендуется, так как нарушается естественный рисунок расположения ворсинок на крыле и на жилках. На одном предметном стекле можно, таким образом, разместить до 40–60 крыльев в 4 каплях раствора Фора. Чтобы избежать образования пузырей воздуха на препаратах, процедуру накопления крыльев в капле нужно проводить как можно быстрее, не допуская «подсыхания» капли раствора Фора.

Подсохнувшие препараты можно микроскопировать. Если мутагенный эффект отсутствует, анализировать нужно не менее 100 крыльев. Чтобы исключить непропорциональное влияние случайных факторов, рекомендуется использовать равное число крыльев в контроле и опыте (Frei, Würigler, 1995).

Фенотипическое проявление мутации *mwh*

Мутация *mwh* имеет несколько вариантов морфологического проявления. В литературе существуют разные точки зрения, считать ли клетки с двумя ворсинками морфозами или истинными мутациями. Мы считаем, что клетки с двумя ворсинками являются истинными мутациями, поскольку такие клетки есть у гомозигот *mwh/mwh*, они встречаются в составе больших пятен и индуцируются гамма-радиацией в той же степени, что и мутация типа *mwh* (Захаренко, Захаров, 1996).

Микроскопический анализ крыльев

Анализ препаратов проводят на световом микроскопе при увеличении × 400. Микроскопирование начинают всегда с одного и того же участка крыла и сканируют крыло в одном направлении, при этом необходимо работать микровинтом, поскольку крыло состоит из двух параллельных слоев клеток, расположенных в разных

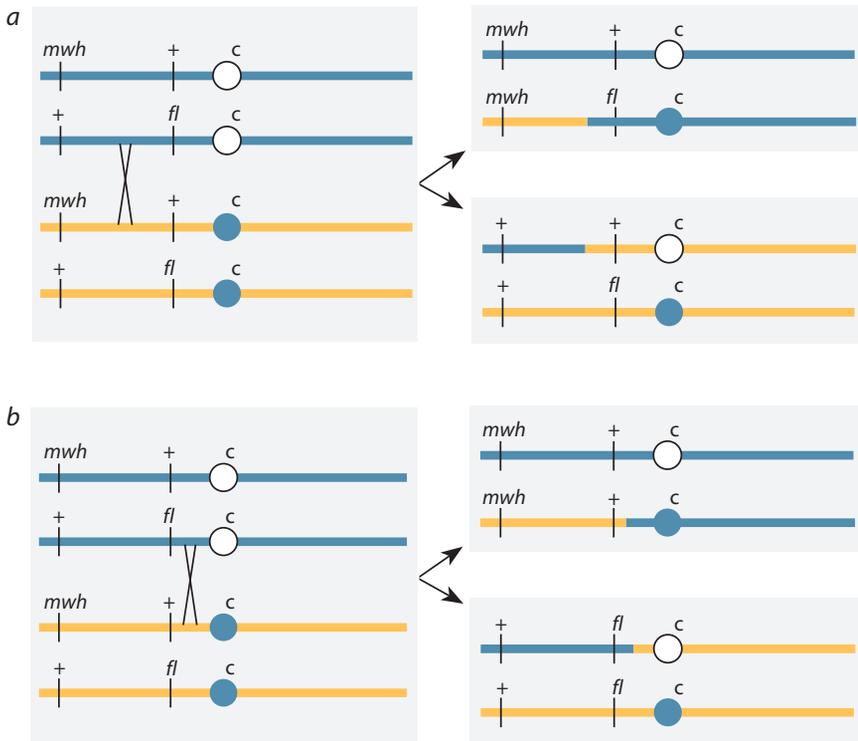


Fig. 2. Schematic representation of recombination events in wing cells of heterozygotes (*mwh/fl*) bringing about (a) single and (b) twin mutant spots.

(a) Recombination between *mwh* and *fl*. (b) Recombination between the chromocenter and *fl*. *c*, chromocenter, «+», normal gene. The recombination region is indicated with crossed lines.

плоскостях. Мутации подразделяют на классы по морфологии и по размеру клеточных клонов:

1. Одиночные пятна – это результат одного мутационного события. Малое пятно состоит из 1–2 клеток. Большое пятно – клон, включающий более двух мутантных клеток, появляющийся на ранних стадиях развития. Малое пятно индуцируется на поздних стадиях личиночного развития, когда крыловой имагинальный диск почти сформирован. Малое пятно может также являться результатом мутационного события, не позволяющего мутантной клетке делиться. Обычно одиночные клетки имеют фенотип *mwh*. Одиночные пятна типа *flr* при спонтанном мутировании практически не встречаются, поэтому в анализ не берутся.

2. Двойные пятна – два контактирующих пятна разных типов. Одно пятно имеет фенотип ворсинок – *mwh*, другое – *flr*. Это событие – результат рекомбинации гомологичных хромосом, прошедшей между локусом *flr* и центромерным районом (рис. 1, 2).

Соматическая рекомбинация может произойти в любом месте хромосомы 3, и тогда одиночное пятно *mwh*, как и двойное пятно, может быть результатом рекомбинационного события. Вычислить долю рекомбинационных событий из общего числа мутаций можно, если «запереть» кроссинговер с помощью балансерной хромосомы с инверсией. Тогда число одиночных пятен заметно уменьшается, особенно сильно уменьшается число больших пятен. Малые пятна могут быть результатом анеуплоидии, возникшей в результате делеции или транслокации нормального гена, позволяющей клетке жить, но препятствующей ее размножению. Не исключается возможность повреждения нормального аллеля гена *mwh*.

Статистический метод для принятия решения о результатах теста на мутагенность, определяющий положительный, отрицательный или неопределенный результат воздействия, подробно описан в работе Н. Frei и F. Würgler (1988).

Acknowledgments

The study was supported by Budgeted Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Arias A.M. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Methods Mol. Biol.* 2008;420:1-25.
- Ashburner M. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Bellen H.J., Tong C., Tsuda H. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010;11: 514-522.
- Drosophila: A practical approach*. Ed. D.B. Roberts. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1986.
- Frei H., Würgler F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 1988;203(4): 297-308.
- Frei H., Würgler F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) *Drosophila*. *Mutat. Res.* 1995;334:247-258.
- Frölich A., Würgler F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 1989;216:179-187.
- Graf U. Temperature effect on *mwh* expression in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Inform. Serv.* 1986; 63:65.
- Graf U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* 1995;51: 168-173.
- Graf U., Frei H., Kagi A., Katz A.J., Würgler F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 1989;222: 359-373.
- Graf U., Singer D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 1992;8(1):15-27.
- Graf U., van Schaik N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 1992;271:59-67.
- Graf U., van Schaik N., Würgler F.E. *Drosophila Genetics: A Practical Course*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.
- Graf U., Würgler F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B., Kale P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila me-*

- lanogaster*. Environ. Mutagen. 1984;6:153-188.
- Greenspan R.J. The origins of behavioral genetics. Curr. Biol. 2008;18: R192-R198.
- Katz A.J., Foley T.A. Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. Environ. Mol. Mutagen. 1993;22(1): 54-58.
- Kinsella A.R., Radman M. Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: relevance to mechanisms of carcinogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1978;75(12):6149-6153.
- Krogulski A. Usefulness of the fruit fly for assessment of mutagenicity of benzene, acetaldehyde and formaldehyde. Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 1994;45:151-155.
- Lawrence P.A., Johnston P., Morata G. Methods of marking cells. *Drosophila*: A Practical Approach. Ed. D.B. Roberts. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1986.
- Lindsley D.L., Zimm G.G. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Acad. Press, Inc. 1992.
- Lombardot B., Oh C.T., Kwak J., Genovesio A., Kang M., Hansen M.A., Han S.J. High-throughput *in vivo* genotoxicity testing: an automated readout system for the somatic mutation and recombination test (SMART). PLoS One. 2015;10(4):e0121287. DOI 10.1371/journal.pone.0121287.eCollection 2015
- Medvedev N.N. Prakticheskaya genetika [Practical Genetics]. Moscow, Nauka, 1966.
- Mollet P., Würgler F.E. Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*: A method for testing genetic activity of chemical compounds. Mutat. Res. 1974;25:421-424.
- Otsenka mutagennosti novykh lekarstvennykh sredstv. Metodicheskie rekomendatsii [Estimation of Mutagenicity of New Drugs. Guidelines]. Moscow, 1991.
- Pandey U.B., Nichols C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. Pharmacological Rev. 2011;63(2):411-436.
- Radman M., Kinsella A.R. Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. IARC Sci. Publ. 1980;(27):75-90.
- Roberts D.B. Basic *Drosophila* care and techniques. *Drosophila*: A Practical Approach. Ed. D.B. Roberts. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1986.
- Rubin G.M., Lewis E.B. A brief history of *Drosophila*'s contribution to genome research. Science. 2000;287:2216-2218.
- Vidal M., Cagan R.L. *Drosophila* models for cancer research. Curr. Opin. Genet. Dev. 2006;16:10-16.
- Vogel E., Blijleven W.G.H., Klapwijk P.M., Zijlstra J.A. Some current perspectives at the application of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens. The Predictive Value of Short-Term Screening Tests in Carcinogenicity. Eds G.M. Williams, R. Kroes, H.W. Waaijers, K.W. Van de Poll. Amsterdam: Elsevier, 1980.
- Wilkinson C.F., Brattsten L.B. Microsomal drug metabolizing enzymes in Insects. Drug Metab. Rev. 1972;1:153.
- Wieshaus E., Nusslein-Volhard Ch. Looking at Embryos. *Drosophila*: A Practical Approach. Ed. D.B. Roberts. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1986.
- Wolf F.W., Heberlein U. Invertebrate models of drug abuse. J. Neurobiol. 2003;54:161-178.
- Yurchenko N.N., Ivannikov A.V., Zakharov I.K. The history of *Drosophila* studies: steps in the development of genetics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):39-49.
- Zijlstra J.A., Vogel E.W., Breimer D.D. Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. Reviews in Biochemical Toxicology. V. 8. Eds E. Hodgston, J.R. Bend, R.M. Philpot. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- Zakharenko L.P., Zakharov I.K. The problem of true and false mutant spots of the *mwh* type in method of somatic mosaics of *Drosophila melanogaster* wing cells. Genetika = Genetics (Moscow). 1996; 32(6):755-758.
- Zakharenko L.P., Zakharov I.K., Borodin P.M., Vasyunina E.A., Dubatolova T.D., Karamysheva T.V. Geneticheskie test-sistemy otsenki mutagennosti (genotoksichnosti) i radioprotektoynykh svoystv. Nauchno-prikladnye razrabotki [Genetic Test-System for Estimation of Mutagenicity (Genotoxicity) and Radioprotective Properties. Research and Application Development]. Novosibirsk, ICG SO RAN, 1997.

Моделирование генетических процессов формирования резистентности к фипронилу в популяциях колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

К.А. Китаев¹, И.С. Марданшин², Е.В. Сурина¹, Т.Л. Леонтьева³, М.Б. Удалов¹, Г.В. Беньковская¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», Уфа, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия

Основным способом контроля численности вредителей остается обработка химическими инсектицидами. Эффективность применения инсектицидов снижается из-за формирования резистентности в популяциях вредителей. Это особенно актуальная проблема при борьбе с колорадским жуком. Для замедления развития устойчивости к химическим препаратам предлагаются разные стратегии применения инсектицидов. На основе данных комплексного многолетнего исследования нами была предложена гипотеза замедления развития устойчивости за счет применения пониженных доз инсектицидов. Мы построили прогностическую дискретную генетическую модель развития устойчивости в популяциях колорадского жука для проверки нашей гипотезы. Модель, основанная на классических уравнениях популяционной генетики, была дополнена действием различных факторов. Расчеты коэффициентов выживаемости особей колорадского жука велись с учетом статистических закономерностей распределения дозы токсического вещества после обработок инсектицидами. Используя логнормальное распределение, мы рассчитали коэффициенты выживаемости разных генотипов при изменении дозы обработки инсектицидами в два и более раз. Дополнительно ввели в модель фактор дифференцированной смертности во время зимовки. Использование данных об изменении соотношения встречаемости фенетических маркеров неспецифической устойчивости к факторам среды позволило провести расчеты модели с опосредованными межгенными взаимодействиями. На данной модели были проверены различные гипотезы в разработке стратегии преодоления резистентности. Расчеты показали, что применение минимально эффективных доз инсектицидов (пониженных доз) приводит к замедлению увеличения доли резистентных особей в популяциях колорадского жука на пару сезонов. При чередовании применения инсектицидов из разных химических классов устойчивость развивается гораздо медленнее. Наиболее оптимальной стратегией являются межсезонное чередование применения инсектицидов разных химических классов и обработка пониженными дозами.

Ключевые слова: защита картофеля; резистентность к инсектицидам; пониженная доза инсектицида; фипронил; генетическое моделирование; популяция; колорадский жук; *Leptinotarsa decemlineata*.

Modeling of genetic processes underlying the development of resistance to fipronil in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

K.A. Kitaev¹, I.S. Mardanshin², E.V. Surina¹, T.L. Leontieva³, M.B. Udalov¹, G.V. Benkovskaya¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics USC RAS, Ufa, Russia

² Bashkirian Institute of Agriculture, Ufa, Russia

³ Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia

The main method of pest control is by applying chemical insecticides. The efficacy of insecticides is reduced due to the development of resistance by pest populations. This is an especially important problem with the Colorado potato beetle. There are different strategies for the use of insecticides to slow the development of resistance. Based on long lasting research, we propose a hypothesis about delaying the development of resistance by applying insecticides at low doses. To test this hypothesis, we have built predictive discrete genetic models of resistance in Colorado potato beetle populations. The model based on the classical equations of population genetics has been supplemented by various factors. Calculations of the survival rates of Colorado potato beetle individuals were carried out taking into account the statistical regularities of the distribution of the toxic substance after treatment by insecticides. We have calculated the survival rates of different genotypes using a lognormal distribution after changing the insecticide dose two-fold or more. The factor of differentiated mortality during the winter was additionally introduced into the model. The use of phenetic markers of nonspecific resistance to environmental factors allowed us to compute the model with mediated intergenetic interactions. Various hypotheses about strategies in overcoming resistance have been tested using this model. Calculations demonstrated that the use of insecticides at minimum effective doses (low dose) leads to a slower increase in the proportion of resistant individuals in populations of the Colorado potato beetle for two seasons. Resistance develops much more slowly

following alternate treatment with insecticides from different chemical classes. The best strategy is through off-season treatment with insecticides of different chemical classes at lower doses.

Key words: protection of potato resistance against insecticides; insecticides at low doses; fip onil; genetic modeling; population; Colorado potato beetle; *Leptinotarsa decemlineata*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Китаев К.А., Марданшин И.С., Сурина Е.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Моделирование генетических процессов формирования резистентности к фипронилю в популяциях колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):78-86. DOI 10.18699/VJ16.112

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kitaev K.A., Mardanshin I.S., Surina E.V., Leontieva T.L., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Modeling of genetic processes underlying the development of resistance to fipronil in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):78-86. DOI 10.18699/VJ16.112

Инсектициды остаются наиболее надежным средством контроля численности насекомых. Но эффективность их применения снижается из-за формирования резистентности (Stankovic et al., 2004; Рославцева, 2005, 2009; Сухорученко, 2005; Baker et al., 2007; Alyokhin et al., 2008; Беньковская и др., 2008а; Alyokhin, 2009; Benkovskaya et al., 2009). Имеющиеся в арсенале агрономов средства защиты картофеля от колорадского жука также потенциально могут стать факторами формирования новых резистентных популяций и утратить свои изначально ценные хозяйственные свойства (Сухорученко и др., 2006). Разработка стратегии применения пестицидов и других технологических факторов, препятствующих формированию резистентных популяций вредных организмов, является не только актуальной научной проблемой, но и важной задачей для бизнеса, направленной как на защиту капитальных вложений в создание препаратов или производство сельхозпродукции, так и на разрешение проблемы сохранения окружающей среды.

Предлагаются различные методы мониторинга развития резистентности, которые позволяют проводить анализ ее формирования в популяциях колорадского жука, хотя разработка мер по предотвращению развития устойчивости продолжает оставаться очень серьезной проблемой (Климец, 1988; Сухорученко и др., 1990, 2006; Zhu et al., 1996; Clark et al., 2001; Рославцева, 2005; Li et al., 2006; Рославцева, Диденко, 2010; Zichova et al., 2010; Удалов, Беньковская, 2010; Jiang et al., 2011).

Возникновение резистентных к инсектицидам популяций насекомых является следствием направленного отбора, действующего в агроценозах. Применяемые в агротехнологиях инсектициды выступают как селективные факторы отбора. Фенотипы, способные преодолевать действие инсектицидов, сохраняются отбором, тогда как неадаптивные элиминируются. Действие других факторов может как снижать выживаемость устойчивых особей, так и повышать ее.

Для решения проблемы формирования резистентности необходимо изучить закономерности этого процесса, влияние природных факторов среды и антропогенного воздействия на повышение или снижение уровня резистентности. По данным комплексного исследования можно построить прогностическую имитационную модель, основанную на взаимодействии различных факторов, с исполь-

зованием которой можно будет взвешенно и обоснованно принимать решение о различных стратегиях замедления развития резистентности (Tabashnik, 1990; Argentine et al., 1994). Основной целью нашего исследования стала проверка гипотез о влиянии различных агротехнических приемов на ускорение или замедление развития резистентности в популяциях колорадского жука. Поскольку на них всегда действует комплекс факторов, необходимо иметь методы оценки воздействия каждого из факторов, а также их совокупности. Для решения этой проблемы необходим достаточно простой и в то же время универсальный математический аппарат, позволяющий изменять при прогнозировании набор условий и затем результаты расчетов экспериментально проверять и уточнять.

Материалы и методы

Для эксперимента по повышению устойчивости к инсектицидам в популяциях колорадского жука использовали препарат «Регент» в виде водно-диспергируемых гранул с содержанием 800,0 г/кг фипронила. Препарат применяется для опрыскивания картофеля в период вегетации. Фипронил воздействует на нервную систему насекомого, связываясь с аллостерическим сайтом рецептора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и блокируя работу хлор-ионного канала, что вызывает гибель вредителя (Narahashi et al., 2007). Норма расхода 0,020–0,025 л/га. Биологическая эффективность действия препарата в период интенсивного питания личинок колорадского жука в полевых условиях составляет 89–99 % (Долженко, 2009). Впервые «Регент» был зарегистрирован и начал применяться на территории Российской Федерации в 1998 г. Широкое применение данного препарата в Республике Башкортостан началось с 2003 г.

Устойчивость насекомых к фипронилю обусловлена наличием мутации в гене *Rdl*, кодирующей субъединицу рецептора ГАМК (Li et al., 2006). Резистентность к фипронилю наследуется рецессивно, но при низких дозах препарата частично проявляется и у гетерозигот (Sayyed, Wright, 2004).

На основе закона Харди–Вайнберга и формулы роста популяции Фишера предложены уравнения, описывающие процессы увеличения или уменьшения частоты аллельных генов при отборе в зависимости от времени (формулы 1–3) (Алтухов и др., 2004).

$$p_{n+1} = \frac{W_1 \cdot p_n^2 + W_2 \cdot p_n \cdot q_n}{W}, \quad (1)$$

$$q_{n+1} = \frac{W_3 \cdot q_n^2 + W_2 \cdot p_n \cdot q_n}{W}, \quad (2)$$

$$W = W_1 \cdot p_n^2 + W_2 \cdot p_n \cdot q_n + W_3 \cdot q_n^2, \quad (3)$$

где p и q – частоты аллельных генотипов, в сумме составляющие 1; W – средняя приспособленность, W_1 , W_2 , W_3 – коэффициенты приспособленности (выживаемости) соответствующих генотипов.

Коэффициент приспособленности каждого генотипа (n) представляет собой сложную функцию $W_n(r, N, K, D, w)$. Основные параметры этой функции: r – плодовитость, N – общая численность, K – емкость среды, D – естественная смертность, w – относительная приспособленность (отношение выживаемости данного генотипа к выживаемости генотипа с максимальным ее значением). В нашем исследовании мы допускаем, что первые четыре параметра не меняются в пределах популяции ($r, N, K, D = \text{const}$), следовательно, в модели их можно не учитывать. Значение параметра w для вариантов гена *Rdl* в популяциях колорадского жука в основном определяется устойчивостью к инсектицидам – R (т.е. $w = R$). Дополнительно рассматриваются следующие параметры: относительная выживаемость в период зимовки (S), влияние неспецифических факторов устойчивости и адаптивности (M). Для удобства мы рассчитывали все параметры в виде коэффициентов, на которые умножали относительную приспособленность w .

Для расчета коэффициентов приспособленности использовали две группы данных. Одни были получены при исследовании увеличения доли резистентных особей колорадского жука на картофельной плантации площадью 30 га в опытно-производственном хозяйстве Бирское Башкирского НИИСХ РАСХН (табл. 1) с применением пониженных доз инсектицида (уменьшение в 2–2,5 раза от рекомендуемой дозы, до 0,01 л/га). Другие собраны при исследовании выборок из различных районов Республики Башкортостан (Марданшин и др., 2012). Оценку доли резистентных имаго в популяциях колорадского жука проводили методом топикального нанесения диагностической дозы препарата (Сухорученко и др., 2006) в виде 1 мкл/особь раствора концентрации 0,001 %-го действующего вещества, которая является удвоенной ЛК95 для колорадского жука.

Результаты и обсуждение

Динамика развития резистентности к инсектициду «Регент» в ОПХ Бирское представлена в табл. 1.

Обозначим s – чувствительный аллель, а r – резистентный. R – устойчивость к инсектицидам, определяемая как доля носителей генотипа, выживающих после обработки. Поскольку резистентность к фипронилу обеспечивается аллелем, который при больших дозах проявляется рецессивно, а при меньших частично рецессивно (Sayyed, Wright, 2004), будем считать, что при действии диагностической дозы инсектицида особь с генотипом ss – является полностью чувствительной ($R_1 = 0$), rs – частично резистентной ($R_2 \sim 0,5$) и rr – абсолютно нечувствительной, резистентной ($R_3 = 1$). Исходя из этого, примем, что

в опытах по оценке доли резистентных особей в выборках выживают примерно половина гетерозигот и все гомозиготы по резистентному аллелю.

Величина порога чувствительности к инсектициду является полиморфным признаком. Кривые зависимости выживаемости особей разных генотипов от концентрации инсектицида, получаемая индивидуальной особью, заметно варьирует, являясь величиной, зависящей от множества факторов и, следовательно, распределенной случайно. Поскольку доза инсектицида не должна быть отрицательной и с течением времени при питании колорадского жука она может значительно увеличиваться, плотность вероятности накопления определенной дозы должна подчиняться функции логнормального распределения (Безель и др., 1994) (рис. 1, б), где x – концентрация, а μ и σ – параметры распределения. Кривая распределения смещена влево (рис. 1, б) (Лакин, 1990). Умножая вероятность выживаемости на вероятность получения определенной дозы, получим кривую выживаемости особей после обработки в полевых условиях. Площадь под получившейся кривой является долей выживших особей (устойчивость к инсектициду в полевых условиях – R') (рис. 1, в). Так как в исходных (чувствительных) популяциях биологическая эффективность фипронила (смертность от инсектицида в агроценозе) составляет 89–99 %, можно рассчитать среднее значение устойчивости для чувствительных генотипов и гетерозигот:

$$f(x) = \frac{1}{x \cdot \sigma \cdot \sqrt{2\pi}} e^{\frac{-(\ln(x) - \mu)^2}{2\sigma^2}}. \quad (4)$$

При использовании небольших интервалов изменения концентрации инсектицида ($0,5 \times 10^{-7}$) рассчитывали функцию распределения (рис. 1, б) и умножали значения для каждой точки на возможную смертность (рис. 1, а). Определив площадь под кривыми результирующих значений (рис. 1, в) методом трапеций, получили в случае применения рекомендованной дозы инсектицида «Регент» следующие значения $R'_1 = 0,06$; $R'_2 = 0,20$; $R'_3 = 1$. При применении пониженных доз инсектицида максимум распределения вероятности получения определенной дозы смещается влево (рис. 1, б, кривая 2), доля выживших особей увеличивается и биологическая эффективность составляет 82–93 %. Значения устойчивости для разных генотипов в этом случае таковы: $R''_1 = 0,125$; $R''_2 = 0,35$; $R''_3 = 1$.

Резистентность к препарату «Регент» в популяциях колорадского жука обнаруживается в разных районах Республики Башкортостан. С 2006 по 2010 гг. доля выборок с устойчивыми особями в стране увеличилась от 13 до 100 %, и средняя доля устойчивых особей в последние годы колеблется от 5 до 10 % (Марданшин и др., 2012). Возможно, что генетическую основу резистентности составляют аллели, которые изначально существуют в популяциях колорадского жука, но не дают каких-либо преимуществ их носителям, являясь генетическим грузом популяции. При построении генетической модели мы взяли в качестве начального значения доли гетерозигот ~ 1 %, что дает нам соотношение частот генов в популяции: 99,5 % для чувствительного аллеля и 0,5 % для резистентного аллеля. Расчетное повышение доли

Table 1. Proportions of Colorado potato beetle individuals resistant to the Regent (fipronil) insecticide applied for several years (after Mardanshin et al., 2012, with authors' addenda)

Year	Group	Rate of resistant individuals
2007	Overwintered	0.000
2008	Overwintered	0.000
2009	Summer generation	0.100 ± 0.019
2010	Overwintered	0.050 ± 0.003
	Summer generation	0.250 ± 0.050
2011	Overwintered	0.200 ± 0.060

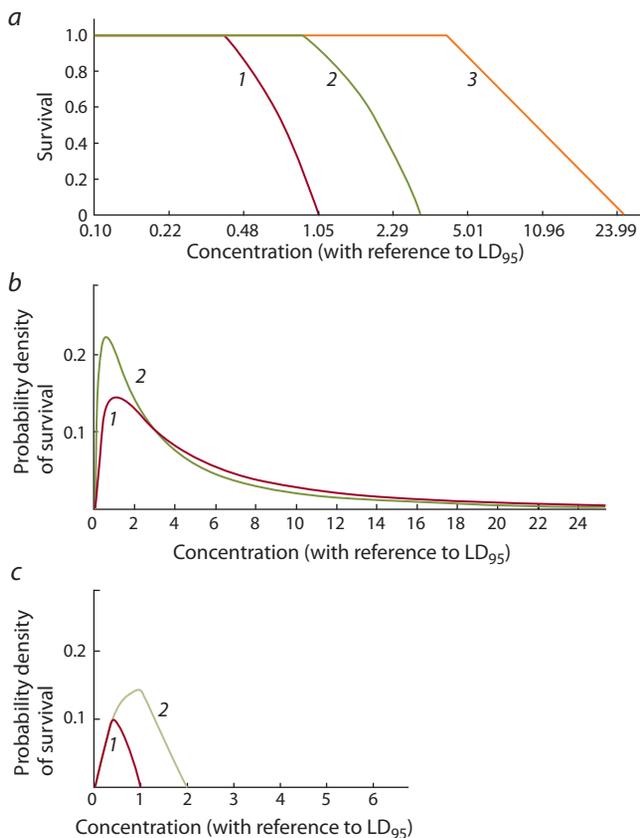


Fig. 1. Survival in the groups of Colorado potato beetles depending on the dose of the insecticide (determined by the substance concentration taken for the treatment) with the assumption of the lognormal probability distribution of dose accumulation.

(a) Survival probability as a function of fipronil concentration in different genotypes: 1, sensitive to the insecticide; 2, heterozygous; 3, resistant to the insecticide (Sayyed, Wright, 2004). (b) Probability density curves of the accumulation of insecticide dose: 1, treatment with the recommended dosage; 2, with the lower dose. (c) Calculated survival curves in the treatment with the insecticide in the field: 1, sensitive homozygote 2, heterozygotes. The areas below the curves are the proportions of survivors.

резистентных генотипов и снижение биологической эффективности в течение ряда сезонов с одной обработкой показано на рис. 2, а. Видно, что резистентность возрастает очень быстро, такое изменение не наблюдается на практике (табл. 1).

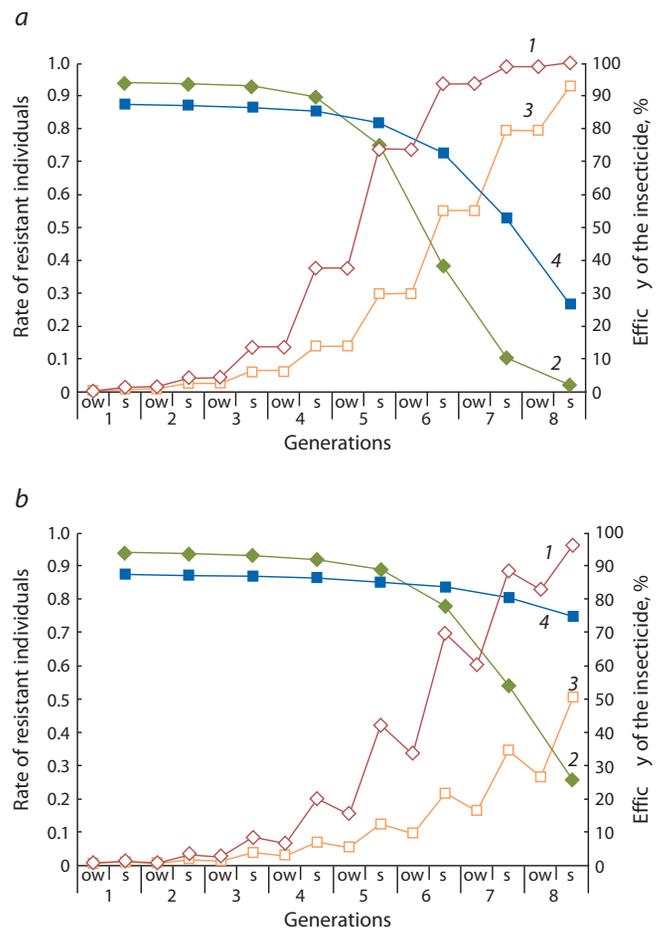


Fig. 2. Calculation of the model of resistance development and decrease in biological efficacy with various Regent doses.

(a) The model not considering winter mortality, (b) the model taking account winter mortality. (1, 2) Ratios of resistant individuals and change of biological efficacy with the recommended dose; (3, 4) ditto, lower dose; ow, overwintered; s, summer generation.

В опыте, проведенном в Бирском ОПХ, отмечено выраженное понижение доли устойчивых у перезимовавших особей по сравнению с выборками из летней генерации (см. табл. 1). Чтобы охарактеризовать изменение частот генотипов, мы ввели и рассчитали дополнительный пара-

метр S – изменение доли генотипа ss в результате зимовки. Значение параметра S составило в 2010 г. 0,47, а в 2011 г. – 0,75. Этот показатель сильно варьирует в зависимости от условий зимовки. Усредняя, примем в расчетах, что при выходе из зимней диапаузы доля выживших составляет 0,7 для гетерозигот и 0,4 для гомозигот. Расчеты накопления доли устойчивых генотипов с учетом смертности имаго во время зимней диапаузы представлены на рис. 2, б. Применение пониженных доз инсектицида дает небольшое преимущество, теоретически при этом развитие резистентности отстает на одно–два поколения, такое же преимущество показано в опыте (Марданшин и др., 2012).

График на рис. 2, б близок к наблюдаемым изменениям резистентности, но со временем расхождения с опытными данными увеличиваются. Для уточнения и получения более полного соответствия рассчитанной доли устойчивых особей значениям, полученным в опыте, мы решили рассмотреть наличие неспецифических механизмов устойчивости.

Неспецифические системы защиты могут менять направление отбора резистентных генотипов, ослабляя воздействие инсектицидов, снижая эффекты патогенеза и других неблагоприятных факторов и в итоге повышая вероятность удачной зимовки. Одним из маркеров действия неспецифических механизмов устойчивости являются системы, связанные с метаболизмом тирозина и биосинтезом меланина. Эти системы участвуют в различных защитных реакциях насекомых – иммунных, стрессовых – и, по-видимому, вносят вклад в формирование устойчивости к некоторым инсектицидам. Показано, что при многократном действии инсектицидов на популяции колорадского жука наблюдается избирательное выживание фенотипов с низкой меланизацией и повышенной плотностью покровов (Беньковская, 2006, 2009; Беньковская и др., 2008б; Zhang et al., 2008). У колорадского жука выделяются три морфотипа по степени меланизации кутикулы: ахромист, меланист и промежуточный тип (Беньковская и др., 2004; Беньковская, 2006, 2009).

Инсектицидный пресс влияет на фенотипическую структуру популяций колорадского жука, приводя к избирательному сокращению частот встречаемости некоторых вариаций фенотипов рисунка покровов (Климец, 1988; Беньковская и др., 2008б; Удалов, Беньковская, 2010; Benkovskaya, Udalov, 2011).

В наших экспериментах связь отдельных фенотипов или целостных морфотипов с устойчивостью к фипронилу не выявляется. Среди особей колорадского жука, выживающих после обработки препаратом в диагностической концентрации, соотношение фенотипов меняется стохастически. Однако с 2007 по 2010 гг. в исследуемых агроценозах при постоянном применении препарата «Регент» возросла доля ахромистов (с 0,08 до 0,24) и особей промежуточного типа (с 0,56 до 0,64), в то время как доля меланистов уменьшилась (с 0,36 до 0,12). Это указывает на возможность влияния механизмов, связанных с меланизацией, на смертность устойчивых к фипронилу особей под действием других факторов среды.

Генетический контроль, определяющий проявление морфотипов, включает множество генов, но у колорадского жука частоты встречаемости морфотипов проявляют

менделевское расщепление с неполным доминированием (Беньковская, 2006, 2009; Беньковская и др., 2008б). По-видимому, ахромисты и меланисты являются гомозиготами (AA и MM соответственно), а промежуточный тип – гетерозиготами (AM). Соотношение морфотипов меняется в течение сезона, поскольку оно зависит от различных факторов среды, но в течение длительных промежутков времени их соотношение должно быть относительно стабильно.

Влияние морфотипа на сохранность генотипов с устойчивостью к фипронилу в различных условиях среды еще недостаточно изучено, и требуются новые исследования. Однако возникает и встречный вопрос – о влиянии доли устойчивых генотипов на соотношение морфотипов, приводящем к увеличению доли ахромистов. Для его выяснения мы введем в рассматриваемую генетическую модель наличие у колорадского жука двух несцепленных генов и, соответственно, девять возможных генотипов (табл. 2). В модель вместо параметра S введем параметр выживаемости M , зависящий от морфотипа и чувствительности к инсектициду.

По нашим наблюдениям, ахромисты лучше, чем меланисты, переживают пониженные температуры и зимовку, раньше выходят из почвы, поэтому нами было сделано предположение, что относительная выживаемость резистентных генотипов в период зимовки в основном зависит от количества ахромистов. Для точного определения этого параметра для каждого генотипа требуются многолетние исследования, но мы ограничимся данными за три года (2007–2010 гг.). Изменяя разные коэффициенты в модели, нашли параметры, которые обеспечивают корректное изменение соотношения морфотипов в популяции, сопряженное с ростом резистентности. Полученный параметр M для ахромистов ($AAss$, $AAsr$ и $AArr$) равен 1 независимо от чувствительности к инсектициду $M_1 = M_2 = M_3 = 1$, для относящихся к промежуточному типу чувствительных к инсектициду гомозигот ($AMss$) $M_4 = 1$ и гетерозигот ($AMsr$) $M_5 = 0,8$, а для резистентных гомозигот ($AMrr$) равен $M_6 = 0,5$; для меланистов чувствительных гомозигот ($MMss$) равен $M_7 = 1$, а для остальных соответственно $M_8 = 0,5$ и $M_9 = 0,4$. В случае с высокой устойчивостью к фипронилу параметр R не зависит от морфотипа. Для получения общего параметра w для каждого генотипа перемножим соответствующие R и M . Графики накопления доли устойчивых особей представлены на рис. 3. По мере увеличения доли ахромистов происходит ускорение развития резистентности. Примерно так же развивается резистентность в экспериментальной популяции колорадского жука (см. табл. 1).

На графиках (1) и (3) рис. 3 видно, как происходит нарастание доли резистентных особей, с постепенным увеличением разрыва между вариантами с разной дозой инсектицида (рекомендованной и пониженной), при этом биологическая эффективность значительно быстрее уменьшается в варианте с рекомендованной дозой. Это еще раз подтверждает вывод о полезности снижения действующей дозы инсектицида до минимально приемлемого уровня биологической эффективности (Марданшин и др., 2012). Применение этого метода вполне оправданно, но наблюдаемое отставание составляет только пару сезонов.

Table 2. Genotypes and calculation of the model with two unlinked genes

Genotypes and proportions		Genotype percentage	
		in the summer generation	after wintering
AAss	k^2p^2	$k^2p^2 \cdot R_1$	$k^2p^2 \cdot R_1 \cdot M_1$
AAsr	k^22pq	$k^22pq \cdot R_2$	$k^22pq \cdot R_2 \cdot M_2$
AArr	k^2q^2	$k^2q^2 \cdot R_3$	$k^2q^2 \cdot R_3 \cdot M_3$
AMss	$2klp^2$	$2klp^2 \cdot R_1$	$2klp^2 \cdot R_1 \cdot M_4$
AMsr	$2kl2pq$	$2kl2pq \cdot R_2$	$2kl2pq \cdot R_2 \cdot M_5$
AMrr	$2klq^2$	$2klq^2 \cdot R_3$	$2klq^2 \cdot R_3 \cdot M_6$
MMss	l^2p^2	$l^2p^2 \cdot R_1$	$l^2p^2 \cdot R_1 \cdot M_7$
MMsr	l^22pq	$l^22pq \cdot R_2$	$l^22pq \cdot R_2 \cdot M_8$
MMrr	l^2q^2	$l^2q^2 \cdot R_3$	$l^2q^2 \cdot R_3 \cdot M_9$
Mean w		Sum of genotype percentages	
Alleles and percentages			
A	k	$(k^2p^2 \cdot R_1 \cdot M_1 + k^22pq \cdot R_2 \cdot M_2 + k^2q^2 \cdot R_3 \cdot M_3 + klp^2 \cdot R_1 \cdot M_4 + kl2pq \cdot R_2 \cdot M_5 + klq^2 \cdot R_3 \cdot M_6) / w$	
M	l	$(l^2p^2 \cdot R_1 \cdot M_7 + l^22pq \cdot R_2 \cdot M_8 + l^2q^2 \cdot R_3 \cdot M_9 + klp^2 \cdot R_1 \cdot M_4 + kl2pq \cdot R_2 \cdot M_5 + klq^2 \cdot R_3 \cdot M_6) / w$	
S	p	$(k^2p^2 \cdot R_1 \cdot M_1 + k^2pq \cdot R_2 \cdot M_2 + 2klp^2 \cdot R_1 \cdot M_4 + 2klpq \cdot R_2 \cdot M_5 + l^2p^2 \cdot R_1 \cdot M_7 + l^2pq \cdot R_2 \cdot M_8) / w$	
R	q	$(k^2q^2 \cdot R_3 \cdot M_3 + k^2pq \cdot R_2 \cdot M_2 + 2klq^2 \cdot R_3 \cdot M_6 + 2klpq \cdot R_2 \cdot M_5 + l^2q^2 \cdot R_3 \cdot M_9 + l^2pq \cdot R_2 \cdot M_8) / w$	

The proportion of overwintered individuals is calculated with reference to the proportion of summer individuals of the previous year. The proportion of summer individuals is deduced from the proportions of alleles and survival after insecticide treatment.

Даже замедленное формирование резистентности приводит к быстрому снижению биологической эффективности обработок, что можно предотвратить только при смене препарата.

Для уточнения возможностей дальнейшего снижения дозы инсектицида мы провели вычислительный эксперимент. Снижение дозы приведет к повышению параметров R_1 и R_2 . Для вычислений взяли ряды из нарастающих значений этих параметров R_1 (0,06; 0,125; 0,15; 0,175; 0,20; 0,225) и соответствующие R_2 (0,18; 0,29; 0,32; 0,36; 0,39; 0,42), рассчитанные по смещению теоретического распределения инсектицидов при обработке. R_3 оставляли неизменным. Вычисленные изменения биологической эффективности представлены на графиках рис. 4. Здесь заметен большой разрыв между начальными вариантами, разница между следующими значениями уменьшается и практически не заметна. Наибольшее замедление снижения биологической эффективности дают варианты с R_1 в диапазоне 0,125–0,15, что соответствует предлагаемому снижению дозы инсектицида (в два–три раза от рекомендуемых значений).

На рис. 5 показано изменение соотношения морфотипов в популяции колорадского жука, полученное при расчете модели с двумя несцепленными генами. В созданной модели происходит постепенное увеличение доли ахромистов, которое не наблюдается в природных условиях, следовательно, можно предположить, что неучтенные в модели факторы могут достаточно сильно влиять на изменение соотношения морфотипов. Одним из таких факторов могут являться природные патогены, в частности, энтомопатогенные грибы, обнаруженные в популя-

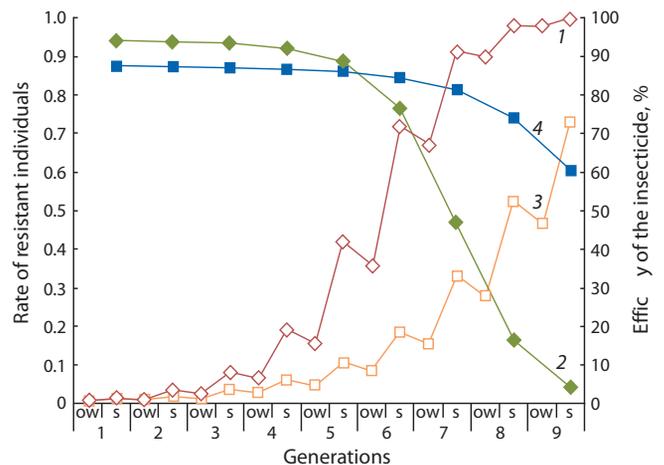


Fig. 3. Calculation of resistance development and decrease in biological efficacy with various Regent doses from the discrete model of a couple of interacting genes.

(1, 2) Ratios of resistant individuals and change of biological efficacy with the recommended dose; (3, 4) ditto, lower dose; ow, overwintered; s, summer generation.

циях колорадского жука (Крюков и др., 2007а, б; Сурина, Беньковская, 2009, 2010; Сурина и др., 2013; Surina et al., 2013). Меланисты имеют большую устойчивость к заражению энтомопатогенными грибами за счет повышенного уровня биосинтеза меланина, который участвует

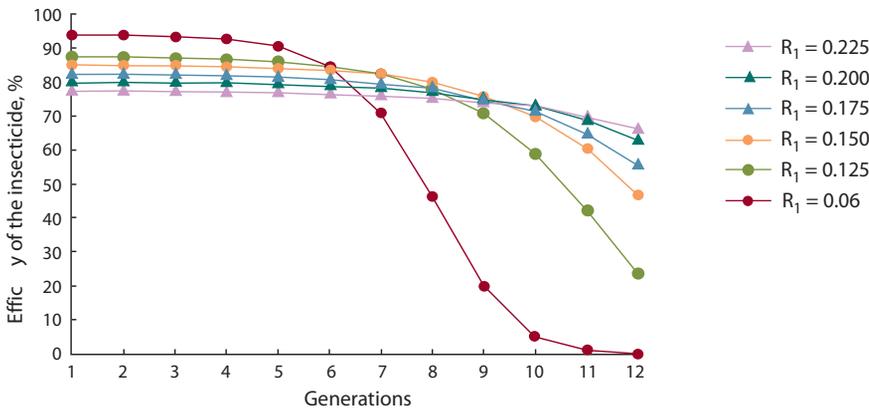


Fig. 4. Reduction of the biological efficacy predicted by calculating the genetic model with dose-dependent rates of sensitive individual survival after treatment with insecticide (R_1).

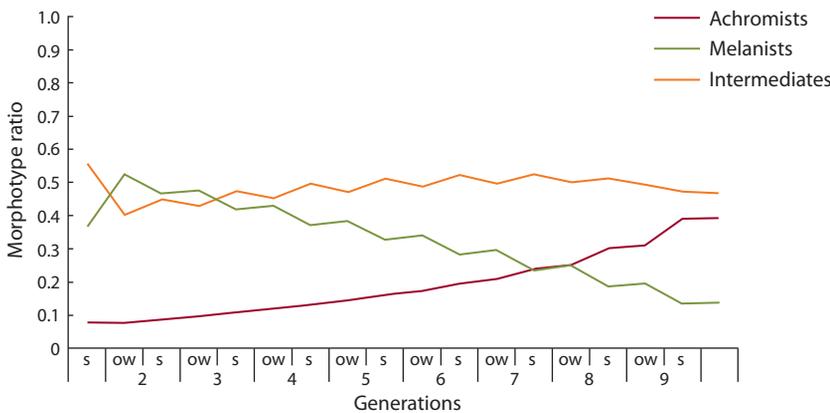


Fig. 5. Changes in the morphotype ratio in the Colorado potato beetle population exposed to lower Regent doses. ow, overwintered, s, summer generation.

в процессе инкапсуляции гиф гриба, проникающего под кутикулу, и снижении эффекта интоксикации (Глунов и др., 2001; Дубовский и др., 2010). Возможно, ахромисты являются менее устойчивыми к заражению микопатогенами, и когда уровень зараженности в популяции возрастает, доля ахромистов может снижаться, при этом уменьшается и доля резистентных особей.

Дополнительно мы провели еще несколько вычислительных экспериментов с разными вариантами модели, добавив ген, мутация в котором определяет резистентность к инсектициду другого класса. При использовании двух инсектицидов одновременно даже при низких дозах удается достичь высокого значения биологической эффективности, но через 9–10 сезонов она начинает быстро снижаться. К тому же высока вероятность развития перекрестной устойчивости путем отбора мутаций в других генах, менее специфичных по действию. Чередование по годам двух инсектицидов разных классов в пониженных дозах позволяет поддерживать высокое значение биологической эффективности в течение 15–16 лет. Опасность развития перекрестной устойчивости сохраняется, но ее можно снизить применением инсектицидов из новых химических классов, до этого не применявшихся.

Привлечение различных данных о состоянии популяций колорадского жука позволяет рассчитать основные параметры изменения соотношения адаптивных и неадаптивных генотипов. Для получения точных значений параметров

необходимо проводить мониторинг в популяциях колорадского жука по нескольким направлениям:

- 1) токсикологические исследования, выявляющие долю резистентных особей в популяции;
- 2) генетические исследования для определения соотношения адаптивных и неадаптивных генотипов, в том числе и с применением фенетического анализа;
- 3) мониторинг уровня зараженности энтомопатогенами для определения возможности естественного снижения резистентности.

Выполнение этих работ позволяет использовать математическое моделирование генетических процессов для прогнозирования и управления формированием резистентности в популяциях вредителя.

Модель, учитывающая две пары генов, достаточно точно отражает процессы, происходящие в популяции колорадского жука при ежегодной обработке препаратом «Регент» (фипронилю). При определенной модификации значений отдельных параметров устойчивости можно применять эту модель в исследовании развития устойчивости к другим инсектицидам. В данной модели предполагается, что резистентность к инсектицидам определяется одним локусом, что наиболее часто наблюдается, хотя сейчас известно, что резистентность к некоторым инсектицидам определяется мутациями в нескольких генах. Неспецифические механизмы можно рассматривать обобщенно, по изменению соотношения морфотипов. Возможно применение и других маркеров устойчивости: биохимических или молекулярно-генетических. Модель позволяет оценить скорость стабилизации генетических процессов в популяциях колорадского жука, которые приводят к формированию резистентности к инсектицидам. Она предсказывает возможность замедления этих процессов, которая подтверждена на практике. Поведение модели позволяет проводить оценку гипотез о состоянии популяций колорадского жука, их адаптивности и лабильности относительно основных факторов отбора, а также проверять те или иные предположения о применимости различных методов замедления формирования резистентности.

Прогнозы генетической модели подтверждают эффективность предложенного нами ранее метода снижения применяемых доз инсектицидов для замедления роста устойчивости (Марданшин и др., 2012). Необходимо продолжить исследование этого метода в производственных условиях для получения дополнительных опытных данных. Биологическая эффективность инсектицида в отношении колорадского жука на уровне 80–87 % является вполне приемлемой при производстве картофеля, дальнейшее снижение дозы станет менее эффективным и, соответственно, экономически невыгодным. Также возможным способом сохранения биологической эффективности может быть чередование инсектицидов разных классов в течение ряда лет. При вводе в хозяйственный оборот инсектицидов новых классов следует применять пониженные дозы для поддержания их биологической эффективности и торможения развития резистентности в популяциях колорадского жука. Для этого необходимо акцентировать внимание на определении минимальных эффективных доз препаратов.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 11-04-1886-a, 11-04-97022-r_povolzhye_a, and 12-04-01450-a.

The authors will be grateful to all colleagues who provide Colorado potato beetle specimens from different parts of its geographic range.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A., Kurbatova O.L., Politov D.V., Evsyukov A.N., Zhukova O.V., Zakharov A.I., Moiseeva I.G., Stolpovsky Yu.A., Pukhalsky V.A., Pomortsev A.A., Upelniak V.P., Kalabushkin B.A. Dinamika populacionnyh genofondov pri antropogennyh vozdeystviyah [Dynamics of Population Gene Pools under Anthropogenic Pressures]. Moscow, Nauka, 2004.
- Alyokhin A., Baker M., Mota-Sanchez D., Dively G., Grafius E. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *Am. J. Potato Res.* 2008;85:395-413.
- Alyokhin A. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, Vegetable and Cereal Sci. and Biotech.* 2009;3(1):10-19.
- Argentine J.A., Clark M.J., Ferro D.N. Computer simulation of insecticide resistance management strategies for control of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Agric. Entomol.* 1994; 11(2):137-155.
- Baker M.B., Alyokhin A., Porter A.H., Ferro D.N., Dastur S.R., Galal N. Persistence and inheritance of costs of resistance to imidacloprid in Colorado potato beetle. *J. Eco. Entomol.* 2007;100:1871-1879.
- Benkovskaya G.V. Differentiation of life strategies and the phenotypes of adult *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Osob i populyatsiya – strategii zhizni. Materialy dokladov IX Vserossiyskogo populyatsionnogo seminar.* [An individual and a population: life strategies. Proceedings of the 9th All-Russia Population Seminar]. Ufa, 2006;1:23-28.
- Benkovskaya G.V. Ecological and physiological characteristics and the Colorado potato beetle adults polymorphism in Bashkortostan. *Nauchnye vedomosti BelGU. Seriya estestvennye nauki=Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences.* 2009;3(8):56-67.
- Benkovskaya G.V., Leontieva T.L., Udalov M.B. Colorado potato beetle resistance to insecticides in the Southern Urals. *Agrokhimiya=Agrochemistry.* 2008a;8:55-59.
- Benkovskaya G.V., Leontieva T.L., Udalov M.B. Colorado beetle resistance to insecticides in South Urals. *Res. Pest Man. News.* 2009; 19(1):3-4.
- Benkovskaya G.V., Udalov M.B. Colorado Potato Beetles Investigations in the South Urals. N.Y.: Nova Science Publ., 2011.
- Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Khusnutdinova E.K. The genetic base and phenotypic manifestations of Colorado potato beetle resistance to organophosphorus insecticides. *Genetika=Genetics (Moscow).* 2008b;44(5):638-644.
- Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Poskryakov A.C., Nikolenko A.G. Phenogenetical polymorphism of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say as a measure of its resistance to insecticides. *Agrokhimiya=Agrochemistry.* 2004;12:1-6.
- Bezel C.S., Bolshakov C.N., Vorobeychik E.L. *Populyatsionnaya ekotoksikologiya [Population Ecotoxicology]*. Moscow, Nauka, 1994.
- Clark J.M., Lee S.H., Kim H.J., Yoon K.S., Zhang A. DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutation associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Man. Sci.* 2001;57:968-974.
- Dolzhenko V.I. Improving the range of insecticides and technologies of their application to protect potatoes against pests. *Agrokhimiya=Agrochemistry.* 2009;4:43-54.
- Dubovskiy I.M., Kryukov V.Yu., Benkovskaya G.V., Yaroslavtseva O.N., Surina E.V., Glupov V.V. Activity of the detoxificative enzyme system and encapsulation rate in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae under organophosphorus insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae* (Metsch.) infection. *Evrasiatskiy Entomologicheskii Zhurnal=Euroasian Entomological Journal.* 2010;9(4):577-582.
- Glupov V.V., Bahvalov S.A., Sokolova Y.Y. *Vnutrennie zashchitnye sistemy nasekomykh [Internal defence systems of insects]. Patogeny nasekomykh: strukturnye i funktsionalnye aspekty.* Pod red. V.V. Glupova [Pathogens of Insects: Structural and Functional Aspects. Ed. V.V. Glupov]. Moscow, Kruglyy god, 2001.
- Jiang W.H., Guo W.C., Lu W.P., Shi X.Q., Xionga M.H., Wanga Z.T., Li G.Q. Target site insensitivity mutations in the ACHE and LD-Vssc1 confer resistance to pyrethroids and carbamates in *Leptinotarsa decemlineata* in Northern Xinjiang Uygur autonomous region. *Pes. Biochem. Physiol.* 2011;100(1):74-81.
- Klimets E.P. Vyyavlenie chuvstvitelnosti koloradskogo zhuka k deystviyu insektitsidov s pomoshchyu fenov [Identification of the Colorado potato beetle susceptibility to the action of insecticides using phenes]. *Fenetika prirodnykh populyatsiy [Phenetics of Natural Populations]*. Moscow, Nauka, 1988.
- Kryukov V.Yu., Lednev G.R., Dubovskiy I.M., Serebrov V.V., Levchenko M.V., Khodyrev V.P., Sagitov A.O., Glupov V.V. New approaches to the biological control of insects by entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycota, Hyphomycetes). *Evrasiatskiy Entomologicheskii Zhurnal=Euroasian Entomological Journal.* 2007a;6(2):195-204.
- Kryukov V.Y., Serebrov V.V., Malyarchuk A.A., Kopzhasarov B.P., Mukhamadiev N.S., Orynbayeva A.K., Khodyrev V.P. Prospects to the use entomopathogenic filamentous fungi (Deuteromycota, Hyphomycetes) against Colorado potato beetle under conditions of South-Eastern Kazakhstan. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki=Siberian Herald of Agricultural Sciences.* 2007b;4: 52-60.
- Lakin G.F. *Biometriya [Biometrics]*. Moscow, Vysshaya shkola, 1990.
- Li A., Yang Y., Wu S., Li C., Wu Y. Investigation of resistance mechanisms to fipronil in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Ecol. Entomol.* 2006;99(3):914-919.
- Mardanshin I.S., Benkovskaya G.V., Kitaev K.A., Surina E.V., Leontieva T.L., Udalov M.B. How we can slow the emergence of resistance to drug Regent in the Colorado potato beetle. *Zashchita i Karantin Rasteniy=Plant Protection and Quarantine.* 2012;5:14-15.
- Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K., Yeh J.Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 2007;26(4):361-366.

- Roslavtseva S.A. Monitoring of the Colorado potato beetle resistance to insecticides. *Agrokhimiya=Agrochemistry*. 2005;2:61-66.
- Roslavtseva S.A. Resistance to insecticides in populations of Colorado potato beetle. *Agrokhimiya=Agrochemistry*. 2009;1:87-92.
- Roslavtseva S.A., Dydenko L.N. Investigations of Colorado potato beetle populations. *Agrokhimiya=Agrochemistry*. 2010;4:80-85.
- Sayyed A.H., Wright D.J. Fipronil resistance in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae): Inheritance and number of genes involved. *J. Ecol. Entomol.* 2004;97(6):2043-2050.
- Sukhoruchenko G.I. Status of resistance in crop pest species in the Russia at the beginning of the XXI century. *Materialy II Vserossiyskogo sezda po zashchite rasteniy [Материалы II Всероссийского съезда по защите растений]*. Saint-Petersburg, 2005.
- Sukhoruchenko G.I., Dolzhenko V.I., Goncharov N.R., Vasilyeva T.I., Ivanov S.G., Ivanova G.P., Taimanov Sh.I., Senkevich S.V., Zverev A.A., Belyh E.B. *Tekhnologiya i metody otsenki pobochnykh effektov ot pestitsidov [Technology and Methods for Assessing Side Effects of Pesticide Application]*. Saint-Petersburg, VIZR Publ., 2006.
- Sukhoruchenko G.I., Zilbermintz I.V., Kuzmichev A.A. *Opredelenie rezistentnosti vreditel'ey selskokhozyaystvennykh kultur i zoofagov k pestitsidam [Determination of Resistance of Crop Pests and Zoophages to Pesticides]*. Moscow, VASKHNIL Publ., 1990.
- Surina E.V., Benkovskaya G.V. Mycosis in populations of *Leptinotarsa decemlineata* Say in the territory of the Republic of Bashkortostan. *Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem «Ekologiya, evolyutsiya i sistematika zhivotnykh» [Proceedings of the All-Russia research and training conference with foreign participants "Animal ecology, evolution, and systematics"]*. Ryazan, 2009.
- Surina E.V., Benkovskaya G.V. Some aspects of co-adaptations of entomopathogenic fungi and the Colorado potato beetle in the Southern Urals. *V Mire Nauchnykh Otkrytiy=In the World of Scientific Discoveries*. 2010;4-1:61-64.
- Surina E.V., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Population-genetic aspects of susceptibility of Colorado potato beetle to fungal infections in the territory of the Republic of Bashkortostan. *Ekologiya=Ecolology*. 2013;3:204-209.
- Surina E.V., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Population genetic aspects of susceptibility of the Colorado potato beetle to mycopathogens in the Republic of Bashkortostan. *Rus. J. Ecology*. 2013;44(3): 227-232.
- Stankovic S., Zabel A., Kostic M., Manojlovic B., Rajkovic S. Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) resistance to organophosphates and carbamates in Serbia. *J. Pest. Sci.* 2004;77: 11-15.
- Tabashnik B.E. Modeling and evaluation of resistance management tactics. *Pesticide Resistance in Arthropods*. Ed. R.T. Roush, B.E. Tabashnik. L.: Chapman and Hall, 1990.
- Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Change of polymorphism level in Colorado potato beetle populations in the Southern Urals. *Ekologicheskaya Genetika=Ecological Genetics (Saint-Petersburg)*. 2010;8(3):61-66.
- Zhang J., Goyer C., Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol.* 2008;17(3): 209-216.
- Zhu Y.K., Lee S.H., Clark J.M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pest. Biochem. Physiol.* 1996;55:100-108.
- Zichova T., Kocourek F., Salava J., Nad'ová K., Stará J. Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods. *Pest. Man. Sci.* 2010;66:853-860.

Фосфорилирование гистона H3Ser10 в делении растительной клетки

Д.Б. Логинова, О.Г. Силкова

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

Гистоны, основные белковые компоненты хроматина, подвергаются посттрансляционным модификациям, которые влияют на особенности структурно-функциональной организации хромосом. Самыми распространенными посттрансляционными модификациями являются фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и убиквитинирование. Фосфорилирование гистонов происходит в основном на N-концевых доменах серинов (Ser) и треонинов (Thr) и задействовано в регуляции различных процессов в митотическом и мейотическом делениях. На сегодняшний день показано, что данный вид модификации необходим для активации транскрипции, репарации разрывов ДНК, рекомбинации, а также для конденсации и расхождения хромосом. Среди четырех основных гистонов для гистона H3 характерно наличие большего числа сайтов модификации. У растений наиболее хорошо изучено фосфорилирование гистона H3 по серину в 10-м и 28-м положениях и треонину в 3, 11, 32 и 133-м положениях. В обзоре собраны известные на настоящий момент данные о пространственно-временном распределении фосфорилирования H3 по серину в 10-м положении (phH3Ser10) в митозе и мейозе у разных видов растений. Для большинства видов характерно фосфорилирование только прицентромерных районов в митозе и во втором делении мейоза, и по всей длине хромосом – в первом делении мейоза. Однако существуют исключения в распределении phH3Ser10 у мхов и в роде *Cestrum* (*Cestrum*), а также у видов с голоцентрическими хромосомами. Встречаются противоречивые данные по распределению phH3Ser10 в митозе и мейозе у одних и тех же видов. Функциональное значение phH3Ser10 в клеточном делении у растений связывают с активностью центромеры, когезией центромер и сестринских хроматид и сегрегацией хромосом. Обсуждается участие известных на данный момент кандидатов киназ и фосфатаз в динамике фосфорилирования H3Ser10. Обзор дает общее представление о роли модификации phH3Ser10 в делении и расхождении хромосом в митозе и мейозе.

Ключевые слова: высшие растения; фосфорилирование; гистон H3; серин; митоз; мейоз.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Логинова Д.Б., Силкова О.Г. Фосфорилирование гистона H3Ser10 в делении растительной клетки. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):87-95. DOI 10.18699/VJ16.132

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Loginova D.B., Silkova O.G. Phosphorylation of histone H3Ser10 in plant cell division. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):87-95. DOI 10.18699/VJ16.132

REVIEW

Received 16.07.2015 г.
Accepted for publication 25.09.2015 г.
© AUTHORS, 2016

 e-mail: loginova@bionet.nsc.ru

Phosphorylation of histone H3Ser10 in plant cell division

D.B. Loginova, O.G. Silkova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Histones, the major protein components of chromatin, undergo post-translational modifications, which particularly affect the structural and functional organization of chromosomes. The most common post-translational modifications are phosphorylation, methylation, acetylation and ubiquitination. Histone phosphorylation occurs mainly at N-terminal tails of serines (Ser) and threonines (Thr), and coordinates various processes of mitotic and meiotic division. It has been shown that this type of modification is required for activation of transcription, DNA damage repair, recombination and also for chromosome condensation and segregation. Histone H3 is characterised by the presence of a large number of modification sites among the four core histones. In plants, phosphorylation of histone H3 at serine positions 10 and 28 and at threonine positions 3, 11, 32 and 133 is the most well studied. This review contains the most complete data on the spatial and temporal distribution of H3 phosphorylation of serine at position 10 (phH3Ser10) in mitosis and meiosis in different plant species. Most species are characterised by phosphorylation of the centromeric region in mitosis and second meiotic division, and by phosphorylation throughout the chromosomes in the first meiotic division. However, there are exceptions to the phH3Ser10 distribution in mosses and *Cestrum*, as well as in species with holocentric chromosomes. There are contradictory data on the phH3Ser10 distribution in mitosis and meiosis in the same species. The functional significance of phH3Ser10 in cell division in plants is associated with the activity of the centromere, centromere cohesion and sister chromatid and chromosome segregation. We discuss the participation of currently known candidate kinases and phosphatases in the dynamics of H3Ser10 phosphorylation. The review provides an overview of the role of phH3Ser10 modification in the chromosome division and segregation in mitosis and meiosis.

Key words: higher plants; phosphorylation of histone H3 at Ser10; mitosis; meiosis.

Хроматин эукариот организован в основные единицы, нуклеосомы, состоящие примерно из 147 пар оснований (п. о.) ДНК, обернутой вокруг гистонового октамера, включающего по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Гистоновые белки состоят из корового домена, который осуществляет взаимодействие между различными гистонами в пределах октамера, и N-концевого фрагмента, посттрансляционные модификации (ПТМ) которого влияют на структуру и функцию хроматина (Wang, Higgins, 2013). Существует по крайней мере восемь различных типов модификаций гистонов, среди которых наиболее изученными являются ацетилирование, метилирование и фосфорилирование (Fuchs et al., 2006; Ito, 2007; Wang, Higgins, 2013; Zhang et al., 2014). Наибольшее число сайтов модификации из четырех основных гистонов описано для гистона H3, и эти модификации участвуют в регуляции генов и сборке хроматина (Ito, 2007).

У растений изучено фосфорилирование гистонов H2A и H3 по остаткам треонина и серина: гистона H2A – по треонину в 120-м и 133-м положениях (phH2AThr120 и phH2AThr133), гистона H3 – по треонину в 3, 11 и 32-м положениях (phH3Thr3, phH3Thr11 и phH3Thr32) и серину в 10-м и 28-м положениях (phH3Ser10 и phH3Ser28) (Gernand et al., 2003; Houben et al., 2005; Caperta et al., 2008; Dong, Han, 2012; Demidov et al., 2014; Zhang et al., 2014). Все эти модификации динамичны и имеют непосредственное отношение к расхождению хромосом, запускаясь на стадии профазы и завершаясь в поздней анафазе или телофазе. Фосфорилирование H2AThr133 и H2AThr120 наблюдается в центромерных и прицентромерных районах как в митозе, так и в мейозе, и, по данным авторов, связано с активностью центромеры (Dong, Han, 2012; Demidov et al., 2014). Фосфорилирование H3Thr3, H3Thr11 и H3Thr32 происходит вдоль всей хромосомы в митозе и первом делении мейоза, но во втором делении мейоза phH3Thr3 ограничивается только центромерной областью, а phH3Thr11 и phH3Thr32 распространяется вдоль хромосом (Houben et al., 2005, 2007; Caperta et al., 2008). Предполагают, что данные модификации вовлечены в компактизацию хромосом.

Фосфорилирование H3Ser10 известно для всех высших растений, однако характер локализации данной ПТМ варьирует в зависимости от типа деления клетки (митоз или мейоз) и вида растений (Houben et al., 1999; Kaszas, Cande, 2000; Manzanero et al., 2000; Pedrosa et al., 2001; Fernandes et al., 2008; Marcon-Tavares et al., 2014). Фосфорилирование H3Ser10 в прицентромерной области хромосом связывают с активностью центромеры (Han et al., 2006; 2009; Gao et al., 2011). Согласно другим данным, фосфорилирование H3Ser10 играет важную роль в активации транскрипции (Ito, 2007). Динамика фосфорилирования гистона H3 по остаткам Ser28 и Ser10 в митозе и мейозе практически не различается, однако phH3Ser28 локализуется в основном в коровой части центромеры (непосредственно на первичной перетяжке), а phH3Ser10 – в прицентромерном районе (Gernand et al., 2003). На основании различного паттерна локализации phH3Ser10 и phH3Ser28 на хромосомах в митозе и мейозе у растений и животных полагают, что у растений обе модификации необходимы для осуществления когезии

сестринских хроматид (Kaszas, Cande, 2000; Manzanero et al., 2000; Gernand et al., 2003; Houben et al., 2007), а у животных – для конденсации хроматина (Hendzel et al., 1997).

Наличие phH3Ser10 у большого числа таксонов: инфузорий (*Tetrahymena thermophile*) (Wei et al., 1998), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), млекопитающих (Hendzel et al., 1997), а также грибов (*Aspergillus nidulans*) и насекомых (*Drosophila melanogaster*) (Wei et al., 1998) свидетельствует о высокой консервативности данной модификации среди эукариот и ее важной роли в делении клетки. Несмотря на большое количество работ, связанных с исследованием фосфорилирования H3Ser10, функция этой модификации в клеточном делении еще не полностью определена. В обзоре представлены известные на сегодняшний день данные о пространственно-временном паттерне фосфорилирования H3Ser10 на хромосомах растений в митозе и мейозе, обсуждается роль данной модификации в клеточном цикле растений, а также рассмотрены кандидаты киназ, участвующих в динамике phH3Ser10.

Фосфорилирование гистона H3 в митозе

Фосфорилирование гистона H3 у видов с моноцентрическими хромосомами

Для большинства исследованных сосудистых растений с моноцентрическими хромосомами показано, что в митозе фосфорилирование гистона H3 по серину в 10-м положении наблюдается в прицентромерной области начиная с профазы и исчезает в телофазе (рис. 1, а–в). Большая часть исследований ведется на однодольных (злаках): ржи (*Secale cereale*) (Houben et al., 1999; Manzanero et al., 2000; Manzanero et al., 2002; Gernand et al., 2003; Oliver et al., 2013); ячмене (*Hordeum vulgare*) (Houben et al., 1999; Manzanero et al., 2002; Gernand et al., 2003); кукурузе (*Zea mays*) (Kaszas, Cande, 2000); пшенице (*Triticum aestivum*) (Gernand et al., 2003), а также на двудольных растениях: бобах (*Vicia faba*) (Houben et al., 1999; Manzanero et al., 2002) и арабидопсисе (*Arabidopsis thaliana*) (Gernand et al., 2003; Oliver et al., 2013).

Первая работа по анализу распределения phH3Ser10 в митозе ржи (*S. cereale*), ячменя (*H. vulgare*) и бобов (*V. faba*) была сделана в 1999 г. методом непрямой иммунофлюоресценции (иммунофлюоресцентный анализ, ИФА) с использованием антител, распознающих гистон H3, фосфорилированный по серину в 10-м положении (Houben et al., 1999). Сигнал иммунолокализации детектировали преимущественно в прицентромерной области хромосомы. Однотипные результаты были получены у кукурузы (*Z. mays*) (Kaszas, Cande, 2000). Фосфорилирование H3Ser10 инициировалось в профазе в прицентромерной области некоторых хромосом, в метафазе и анафазе у всех хромосом наблюдали яркий сигнал в прицентромерной области, который исчезал в телофазе (Kaszas, Cande, 2000).

Центромерную локализацию сигналов phH3Ser10 иммунофлюоресценции также наблюдали у пшеницы (*T. aestivum*), арабидопсиса (*A. thaliana*) и ячменя (*H. vulgare*) (Gernand et al., 2003). Однако, по данным Oliver с коллегами (2013), фосфорилирование H3Ser10 у *A. thaliana* в метафазе–анафазе происходило по всей длине хромосом (Oliver et al., 2013). Наблюдаемые различия могли быть

связаны со сложностью интерпретации данных на хромосомах небольшого размера. С другой стороны, распространение фосфорилирования на всю длину хромосом в анафазе митоза было детектировано также в делящихся ВУ-2 клетках (Kawabe et al., 2005; Kurihara et al., 2006) и протопластах, выделенных из листьев табака (*Nicotiana tabacum*) (Li et al., 2005). Как и в других случаях, фосфорилирование начиналось в профазе, на стадиях метафазы и ранней анафазы оно наблюдалось только в области центromеры, однако в поздней анафазе распространялось на всю длину хромосом и постепенно исчезало в телофазе (Kawabe et al., 2005; Li et al., 2005; Kurihara et al., 2006). Воспроизводимость результатов ИФА в нескольких работах на табаке исключает ошибку метода. Возможно, такой паттерн фосфорилирования видоспецифичен, кроме того, все три работы проводились не на клетках апикальной меристемы корня (как в большинстве других работ), а на протопластах или отдельных клеточных культурах, что также могло быть причиной таких отличий.

У видов с крупными хромосомами многие авторы отмечали наличие сигнала иммунолокализации антител к фосфорилированному гистону H3Ser10 в прицентромерной области и его отсутствие непосредственно в месте первичной перетяжки в митозе (Houben et al., 1999; Fernandes et al., 2008; Marcon-Tavares et al., 2014).

Отсутствие pH3Ser10 в коровом районе центromеры хорошо проиллюстрировано на хромосомах ячменя при помощи иммуноокрашивания с наночастицами золота и сканирующей электронной микроскопии (Schroeder-Reiter et al., 2003). Данная особенность может быть связана с заменой гистона H3 в области центromеры на его центромеспособный вариант, CENH3, а отсутствие такого промежутка в локализации антител к pH3Ser10 у видов с более мелкими хромосомами – с меньшим размером центромерной области (Houben et al., 1999; Marcon-Tavares et al., 2014).

Среди сосудистых растений прицентромерный паттерн pH3Ser10 обнаружен также у других представителей однодольных (Pedrosa et

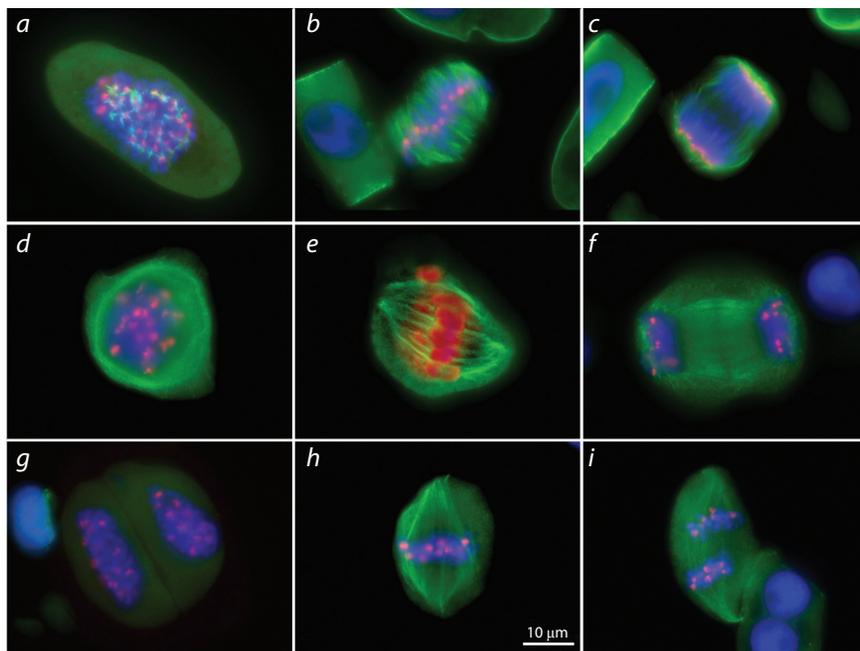


Fig. 1. Phosphorylation of H3Ser10 in *Triticum aestivum*: (a–c) mitosis, (d–i) meiosis.

a, Prophase; b, metaphase; c, late anaphase; d, prophase I; e, metaphase I; f, telophase I; g, prophase II; h, metaphase II; i, anaphase II. Blue coloration indicates chromosomes stained with DAPI; green, α -tubulin of spindle microtubules; red, phosphorylated H3Ser10. Scale bar 10 μ m.

al., 2001; Manzanero et al., 2002; Feitoza, Guerra, 2011; Marcon-Tavares et al., 2014) и двудольных растений (Fernandes et al., 2008; Marcon-Tavares et al., 2014), а также у папоротникообразных, плауновидных и голосеменных растений (Marcon-Tavares et al., 2014). Отметим, что у растений птицемлечника (*Ornithogalum longibracteatum*) семейства Спаржевые (*Asparagaceae*) была показана корреляция pH3Ser10 с наличием центромерного тандемного повтора Sat1, присутствующего как в центromере, так и в области интеркалярного гетерохроматина (в меньшем количестве) (Pedrosa et al., 2001).

Фосфорилирование у видов с голоцентрическими хромосомами и мхов

Среди высших растений представители видов: хионографис японский (*Chionocephalus japonica* Maxim.) из семейства Лилейные (*Liliaceae*) и мускатный орех (*Myristica fragrans* Hout.) из семейства Мускатниковые (*Myristicaceae*); одного из подродов Повилика (*Cuscuta*) семейства Вьюнковые (*Convolvulaceae*); рода Росянка (*Drósera*) (но не других Росянковых), а также представители двух семейств, Ситниковые (*Juncaceae*) и Осоковые (*Cyperaceae*), имеют голоцентрические хромосомы (Guerra et al., 2006), поведение и структура которых в митозе существенно отличается от моноцентрических. Основными особенностями голоцентрических хромосом являются: отсутствие первичной перетяжки в прометафазе и метафазе, прикрепление микротрубочек веретена деления по всей длине хромосом и параллельное расхождение сестринских хроматид в анафазе (Germand et al., 2003; Guerra et al., 2006).

Отличия в структуре митотических хромосом повлекли за собой отличие в паттерне фосфорилирования H3Ser10 (Germand et al. 2003; Guerra et al., 2006). У ожики (*Luzula luzuloides*) (сем. Ситниковые, *Juncaceae*) сигналы иммунофлюоресценции pH3Ser10 становились видимыми с началом конденсации хромосом на ранних стадиях профазы. Стабильный сигнал наблюдали по всей длине хромосомы в мета- и анафазе. Флуоресценция исчезала с деконденсацией хромосом в телофазе (Germand et al., 2003). Сходные результаты были получены для растений очеретника (*Rhynchospora tenuis*) (сем. Осоковые,

Сурепеае) (Guerra et al., 2006). Marcon-Tavares с соавторами (2014) наблюдали фосфорилирование митотических хромосом по всей длине также и у других представителей семейства Осоковые, а именно: еще одного вида очеретника (*Rhynchospora pubera*), болотницы (*Eleocharis geniculata*), фимбристилиса (*Fimbristylis miliacea*).

Недавние исследования в данной области показали, что среди высших растений, кроме растений с голоцентрическими хромосомами, фосфорилирование по всей длине хромосомы в митозе наблюдается также у мхов (бриофитов) (Marcon-Tavares et al., 2014). У растений нототиласа (*Notothylias vitalii*) (сем. Нототиласовые) и риччии (*Riccia plano-biconvexa*) (сем. Риччиевые) флюоресцентный сигнал становился видимым в профазе диффузно по всей хромосоме, достигал максимума к метафазе и исчезал в ранней телофазе. У *N. vitalii* и *R. plano-biconvexa* первичных перетяжек не наблюдали, но V- или I-образная форма хромосом в анафазе позволяла предположить, что они являются типичными моноцентриками. Авторы предположили, что характер фосфорилирования хромосом в митозе мохообразных более близок к фосфорилированию хромосом животных, чем филогенетически изолированных голоцентрических хромосом растений. Также в работе отмечали, что возможной причиной отсутствия pH3Ser10 на плечах хромосом у сосудистых растений с моноцентрическими хромосомами послужило приобретение компенсирующих модификаций ввиду необходимости приспособливаться к окружающей среде (Marcon-Tavares et al., 2014).

Фосфорилирование гистона H3 в мейозе

Фосфорилирование гистона H3 в норме у растений

Фосфорилирование гистона H3Ser10 в мейозе растений значительно отличается от такового в мейозе животных или в митозе растений (в случае первого деления) (Manzanero et al., 2000). У ржи (*S. cereale*) и пшеницы (*T. aestivum*) первые диффузные сигналы pH3Ser10 наблюдали при переходе от лептотены к зиготене. В диакинезе иммунолокализацию антител к pH3Ser10 наблюдали по всей длине хромосом, но более интенсивный сигнал отмечен в области центромеры. Пик фосфорилирования вдоль хромосомы приходился на метафазу I, в телофазе I фосфорилирование постепенно исчезало. В начале профазы II конденсация хромосом совпадала с новым этапом фосфорилирования H3Ser10, начинающегося в отдельных областях. В конце профазы II и в метафазе II в центромерной области наблюдали яркие сигналы иммунолокализации, в то время как плечи хроматид были очень слабо помечены. Фосфорилирование в районе центромеры сохранялось после разделения сестринских хроматид в анафазе II, в телофазе II оно постепенно исчезало, совпадая с началом деконденсации хромосом (Manzanero et al., 2000). Сходные данные были получены на кукурузе (*Z. mays*) (Kaszas, Candé, 2000). Отличия от ржи (*S. cereale*) и пшеницы (*T. aestivum*) заключались в том, что у кукурузы в профазе I на стадиях лептотены и диакинеза присутствовало два сигнала на ядрышкообразующих районах, а в пахитене – только один сигнал, когда хромосомы были полностью спарены. Распространение сигнала на всю

длину хромосом в прометафазе совпадало с разрушением ядерной оболочки. Во втором делении у кукурузы, в отличие от ржи и пшеницы, фосфорилирование полностью исчезало к началу телофазы II.

Фосфорилирование гистона H3 у растений с унивалентными хромосомами

Характер фосфорилирования H3Ser10 на унивалентных хромосомах был изучен на примере мейоза ржи (*S. cereale*), геном которой содержит добавочные В-хромосомы; гаплоидной пшеницы (*T. aestivum*), а также моносомной дополненной линии пшеницы, к геному которой добавлено длинное плечо хромосомы ржи 5RL (Manzanero et al., 2000). Общая картина распределения сигнала pH3Ser10 в первом делении мейоза соответствовала фосфорилированию гистона H3 у растений ржи без В-хромосом (Manzanero et al., 2000). В метафазе I и анафазе I В-хромосомы ржи и униваленты пшеницы были фосфорилированы по всей длине хромосом наравне с бивалентами. Различия в картине фосфорилирования становились очевидными в метафазе–анафазе второго деления. Одиночные хроматиды, располагающиеся отдельно от остальных хромосом в метафазе II или задерживающиеся в эквационной плоскости в анафазе II, не имели флюоресцентных сигналов pH3Ser10 в прицентромерной области, но были прикреплены к микротрубочкам веретена деления.

Особенности фосфорилирования гистона H3 у *Cestrum strigilatum*, несущего одну В-хромосому

К настоящему моменту только для одного вида растений, цеструма (*Cestrum strigilatum*), была показана прицентромерная (в отличие от фосфорилирования по всей длине хромосом у других видов) локализация pH3Ser10 в первом делении мейоза. *C. strigilatum* – двудольное растение, относящееся к семейству Пасленовые (Solanaceae), характеризуется наличием в геноме В-хромосом (Fernandes et al., 2008). У исследованных растений в 23 % мейоцитов наблюдалось наличие унивалентной В-хромосомы, всегда расположенной отдельно от А-хромосом. В-хромосома задерживалась на экваторе в первом делении и делилась на хроматиды во втором делении мейоза. И в первом, и во втором делениях мейоза фосфорилирование А-хромосом проходило только в прицентромерной области и детектировалось начиная с пахитены до поздней анафазы I, полностью исчезая в телофазе I. Затем детекция сигнала воспроизводилась начиная с профазы II до ранней телофазы II. Временное распределение фосфорилирования на В-хромосомах в первом делении не отличалось от такового у А-хромосом, однако происходило по всей длине, за исключением терминального района длинного плеча. Во втором делении флюоресцентный сигнал на разошедшихся В-хроматидах не наблюдали. Авторы объяснили отличие мейотического фосфорилирования H3Ser10 *C. strigilatum* от других видов, описанных в литературе, видовыми особенностями и предположили, что оно может быть связано с «движением» (motility) хромосом, но не с конденсацией или когезией (Fernandes et al., 2008). Хотя авторы сделали вывод о различии паттерна фосфорилирования у А- и В-хромосом, размер

сайтов локализации антител практически не отличался. Возможно, фосфорилируемая прицентромерная область В-хромосомы занимает почти всю ее длину, тем более что у сосудистых растений размер блоков иммунолокализации антител к рhH3Ser10 относительно стабилен между хромосомами в пределах кариотипа даже у видов со значительно различающейся морфологией хромосом, например телоцентрических и метацентрических у нотоскордума (*Nothoscordum pulchellum*), или с большой разницей в размере хромосом, как у ципуры (*Cipura paludosa*) (Marcon-Tavares et al., 2014). У элеутерины (*Eleutherine bulbosa*) крупнейшая хромосома в пять раз больше, чем мелкие, но все они показали аналогичные по размеру прицентромерные флюоресцентно окрашенные блоки рhH3Ser10 (Feitoza, Guerra, 2011).

Случаи противоречивых данных по фосфорилированию гистона H3 в митозе и мейозе

Для растений с небольшим геномом иммунофлюоресцентный анализ затруднен, поскольку сложно получить четкую картину распределения сигналов при малом размере хромосом (Gernand et al., 2003; Oliver et al., 2013; Paula et al., 2013). Как результат – разнящиеся данные по паттерну фосфорилирования у одних и тех же объектов (Gernand et al., 2003; Oliver et al., 2013) или трудно сопоставимые данные иллюстраций и текстового сопровождения материала (Paula et al., 2013). Так, в митозе арабидопсиса (*A. thaliana*) первые различимые сигналы локализации антител к рhH3Ser10 появлялись с началом конденсации хромосом в ранней профазе. В метафазе и анафазе яркие сигналы были хорошо различимы в прицентромерной области хромосом и исчезали с началом их деконденсации в телофазе (Gernand et al., 2003). Однако, по данным Oliver с коллегами (2013), фосфорилирование начиналось не с началом конденсации хромосом, а в середине – конце профазы. К метафазе оно распространялось на плечи хромосом и исчезало в конце телофазы. Кроме того, в мейозе *A. thaliana* наблюдали отличия от уже известных данных по другим растениям (Manzanero et al., 2000). Фосфорилирование H3Ser10 начиналось в диплотене в прицентромерной области (а не при переходе от лептотены к зиготене, как у кукурузы, Manzanero et al., 2000). Следующей неожиданностью оказалось распространение рhH3Ser10 на плечи хромосом во втором делении мейоза, т.е. картина фосфорилирования была аналогична наблюдаемой в первом делении мейоза (Oliver et al., 2013).

В мейозе брахиарии (*Brachiaria ruziziensis*, *B. decumbens* и *B. brizantha*) (сем. Злаковые, Gramineae) описана иная картина фосфорилирования (Paula et al., 2013). У всех исследованных растений во время первого деления фосфорилирование H3 распространялось на целые хромосомы и исчезало в телофазе I. Несмотря на то что сами авторы описали паттерн фосфорилирования во втором делении мейоза как прицентромерный, на иллюстрациях к статье распределение флюоресцентного сигнала совпадает с контурами DAPI-окрашенных хромосом, т.е. идет по всей длине хромосом (Paula et al., 2013). Ошибка интерпретации возможна вследствие малого размера компактизованных мейотических хромосом во втором делении.

Несоответствия в картине фосфорилирования можно отметить и в работах с растениями, имеющими крупные хромосомы, например с бобами (*V. faba*) (Houben et al., 1999; Demidov et al., 2005). Так, в работе Houben с коллегами были отмечены слабое окрашивание плеч хромосом и яркий сигнал в прицентромерной области в метафазе – анафазе митоза (Houben et al., 1999). В более поздней работе, выполненной на том же объекте, была показана строгая прицентромерная локализация флюоресцентного сигнала на акроцентрической хромосоме и отсутствие такового на плечах хромосомы (Demidov et al., 2005). Наблюдаемое отличие могло быть связано с особенностями используемого метода. Для непрямого ИФА в том и другом случаях использовали поликлональные антитела, а детекцию флюоресцентного сигнала вели с помощью эпифлюоресцентной микроскопии (EfM, Epifluorescence Microscopy). Оба этих фактора имеют некую погрешность, связанную со специфичностью сигнала и оптическим разрешением. Поликлональные антитела имеют ряд особенностей, способствующих появлению «фонового» (неспецифичного) сигнала, следующих из способа получения. Сыворотка поликлональных антител состоит из продуктов секреции нескольких клонов В-лимфоцитов, которые имеют разную специфичность (антитела к отличающимся участкам связывания с антигеном и даже к разным антигенам), аффинность (сродство к связываемому антигену) и др. (Свешников и др., 2006). Кроме того, из-за объемности клеточных препаратов оптическое разрешение хромосом, анализируемых с помощью обычной EfM микроскопии, ограничено.

Отличия в картине фосфорилирования H3Ser10 были отмечены при анализе хромосом митотических препаратов ржи (*S. cereale*) (Houben et al., 1999). Различия в распределении флюоресцентного сигнала авторы связывали с использованием разных способов фиксации данных, а именно: обычной эпифлюоресцентной микроскопии (EfM) и вычислительной деконволюционной микроскопии (CDM, Computational Deconvolution Microscopy). В случае использования EfM наблюдался слабый сигнал на плечах хромосом и более яркий сигнал в прицентромерной области. С другой стороны, при использовании CDM яркие сигналы наблюдали в прицентромерной области, с единичными точечными сигналами в области плеч хромосом. Однако авторы отметили, что деконволюционная микроскопия имеет тенденцию к повышению ярких сигналов при понижении или даже устранении слабых (Houben et al., 1999; Wallace et al., 2012).

Функциональное значение фосфорилирования в делении растительной клетки

Фосфорилирование гистона H3Ser10 коррелирует с когезией сестринских хроматид

Хотя фосфорилирование H3Ser10 коррелирует с конденсацией хромосом в митозе у животных (Hendzel et al., 1997), а также в митозе и мейозе низших эукариот, например, инфузорий (Wei et al., 1999), причинно-следственная связь между ними до сих пор не ясна. Предполагалось, что у животных фосфорилированный гистон H3 привлекает к хромосоме топоизомеразу 2 (Hendzel et al., 1997). Однако

для мейоза это оказалось не так. В мейозе мышей локализация топоизомеразы 2 на хромосомах и их конденсация начинались в ранней профазе, а фосфорилирование наблюдалось в поздней профазе I (Cobb et al., 1999).

По аналогии с животными в первых работах на растениях также высказывались предположения о возможном участии фосфорилирования в конденсации хромосом (Houben et al., 1999), поскольку начало фосфорилирования совпадало с началом конденсации и исчезало с деконденсацией хромосом. Однако в более поздних работах показано, что фосфорилирование связано скорее с когезией сестринских хроматид в митозе и мейозе, а не со степенью их конденсации (Kaszas, Cande 2000; Manzanero et al., 2000; Manzanero et al., 2002; Brasileiro-Vidal et al., 2005; Feitoza, Guerra, 2011). В пользу этого предположения свидетельствует ряд данных. Во-первых, отсутствие сигналов иммулокализации антител к pH3Ser10 на нормально конденсированных задерживающихся хроматидах и фрагментах хромосом в митозе гибридов с нестабильным геномом (Brasileiro-Vidal et al., 2005), а также на одиночных хроматидах во втором делении мейоза гаплоидных растений пшеницы и В-хроматидах ржи (Manzanero et al., 2000). Во-вторых, у растений элеутерины (*E. bulbosa*), для которых известна четко определяемая ранняя конденсация первой пары хромосом в профазе, не наблюдали ни преждевременного, ни более интенсивного фосфорилирования данных хромосом (Feitoza, Guerra, 2011). В-третьих, начало фосфорилирования хромосом не совпадает с началом их конденсации в первом мейотическом делении у кукурузы. Четкие сигналы pH3Ser10 на всех хромосомах наблюдали лишь при переходе от диакинеза к прометафазе, когда хромосомы были уже полностью конденсированы (Kaszas, Cande 2000).

Отсутствие связи pH3Ser10 с конденсацией хромосом было установлено у ячменя и ржи (Manzanero et al., 2002). Использование ингибиторов фосфатазы (кантаридина и оадаевой кислоты) не имело сильного влияния на фосфорилирование гистона H3 и не приводило к преждевременной конденсации хромосом в интерфазе (Manzanero et al., 2002). Наблюдаемое в митозе уменьшение длины конденсированных хромосом, гиперфосфорилированных по всей длине, было сопоставимо с укорочением хромосом, вызванным холодной обработкой, при которой дополнительные сайты фосфорилирования появлялись лишь в некоторых участках плеч, но не по всей длине хромосом (Manzanero et al., 2002). Эти данные отличаются от результатов, полученных на животных (Guo et al., 1995). При обработке культуры раковых клеток мыши оадаевой кислотой и фострейцином (ингибиторами фосфатаз PP1 и PP2A) фосфорилирование гистона H3 и полную конденсацию хромосом наблюдали уже на стадии G2 (Guo et al., 1995).

Кроме того, фосфорилирование H3Ser10, начинающееся в прицентромерных районах, распространяющееся на плечи хромосом в метафазе I и наблюдаемое только в прицентромерных районах в метафазе II мейоцитов, согласуется с изменениями когезии сестринских хроматид, а не с конденсацией хромосом (Kaszas, Cande, 2000; Manzanero et al., 2000). Однако фосфорилирование гистона H3 не может в полной мере отвечать за когезию

хроматид, поскольку взаимосвязь между ними не является совершенной: оба процесса начинаются и заканчиваются не одновременно. Например, сестринские хроматиды разделяются в анафазе митоза, а фосфорилирование исчезает только в телофазе. Также в первом делении мейоза когезия сестринских хроматид наблюдается в лептотене, однако может изменяться в зиготене и к началу анафазы I почти полностью отсутствует (Cai et al., 2003). По этой же причине фосфорилирование не может отвечать за инициацию когезии (Kaszas, Cande, 2000).

Согласно Kaszas и Cande (2000), фосфорилирование может участвовать в регуляции или поддержании когезии в центромерных районах. При изучении мутантов кукурузы *afd1* (*absence of first division 1* – ген, кодирующий мейоз-специфичный когезин Rec8), в первом делении мейоза которых образуется 20 унивалентов, авторы отмечали разделение сестринских хроматид в анафазе I, так же как при митотическом делении. Когда хромосомы образуют метафазную пластинку, фосфорилирование наблюдается только в прицентромерных районах, в то время как во втором делении мейоза на индивидуальных сестринских хроматидах сигнал иммулокализации антител к фосфорилированному гистону H3 отсутствует (Kaszas, Cande, 2000). Участие фосфорилирования в когезии центромерных районов подтверждается также работой на *C. strigilatum*, для которого авторы показали прицентромерную локализацию иммунофлюоресцентного сигнала антител к pH3Ser10 как в митозе, так и в двух делениях мейоза (Fernandes et al., 2008).

pH3Ser10 – эпигенетический маркер активной центромеры

Связь фосфорилирования H3Ser10 с активностью центромер была отмечена в нескольких работах по изучению полудицентрических (Houben et al., 1999) и дицентрических хромосом (Han et al., 2006; 2009; Gao et al., 2011; Zhang et al., 2013). В исследуемых полудицентрических и дицентрических хромосомах присутствует только одна активная центромера, несмотря на наличие традиционных последовательностей центромерной ДНК в обеих центромерах (Tu/*gypsy* ретроэлементов ячменя или 156 п. о. сателлитных tandemных повторов и ретротранспозонов CRM кукурузы). Полудицентрические хромосомы 5³ ячменя линии T3-5u были образованы при реципрокной транслокации с точками разрыва в области центромеры хромосомы 3 и длинного плеча хромосомы 5. Отсутствие нарушений в митозе указывало на активность только одной из центромер. Только центромера хромосомы 5, образующая более четкую первичную перетяжку, чем частичная (с низким числом копий центромерных последовательностей) центромера хромосомы 3, имела четкий сигнал локализации антител к фосфорилированному гистону H3. Кроме того, в профазе митоза насчитывалось только 14 сигналов, соответствующих количеству активных центромер в клетке (Houben et al., 1999).

Дицентрические хромосомы кукурузы (*Z. mays*) T1-5 были получены в результате транслокации между А-хромосомами 1 и 5, с захватом центромеры между точками разрыва (Gao et al., 2011). Авторы показали, что только в месте первичного сужения, соответствующего

активной центромере, наблюдалось наличие сигналов CENP-C и pHH3Ser10. Второй кластер центромерных последовательностей не имел сигналов локализации антител к CENP-C и pHH3Ser10 (Gao et al., 2011). Хромосомы кукурузы Dic-15 (Han et al., 2006, 2009) и sDic-15 (Zhang et al., 2013) содержат две центромеры В хромосом, и только одна из них активна и фосфорилирована по гистону H3Ser10. Активность данной центромеры подтверждалась наличием сигнала локализации антител к CENH3, а также других, свойственных для активной центромеры, модификаций, таких как pHH2AThr133 и pHH3Thr3 (Zhang et al., 2013). Независимо от того, происходили ли неактивные центромеры от А- или В-хромосом, фосфорилирование гистонов происходило только по активным центромерам.

С другой стороны, в анафазе второго деления мейоза у гаплоидной и 5RL моносомно дополненной линий пшеницы (*T. aestivum*) Manzanero с соавторами (2000) наблюдали наличие отстающих одиночных хроматид без иммунофлуоресцентного сигнала pHH3Ser10 в области центромеры, которые были связаны с микротрубочками веретена. Сходные результаты были получены и для задерживающихся В-хроматид во втором делении мейоза у растений ржи (Manzanero et al., 2000). Согласно выводам авторов, фосфорилирование не определяло способность кинетохор связываться с микротрубочками веретена.

И когезия, и функциональная активность центромерных районов направлены на осуществление сегрегации хромосом в первом делении мейоза и сестринских хроматид в митозе и мейозе II. Связь фосфорилирования с сегрегацией центромер в митозе была показана при анализе межродовых пшенично-пырейных гибридов (Brasileiro-Vidal et al., 2005). У потомков 5-го и 7-го поколений от самоопыления дважды беккроссированных пшенично-пырейных гибридов (*T. aestivum* × *Thinopyrum ponticum*) Brasileiro-Vidal с соавторами (2005) наблюдали отклонение в фосфорилировании H3Ser10 в клетках с различными аномалиями. Фосфорилирование гистона H3 в митозе гибридов *T. aestivum* × *Th. ponticum* начиналось в профазе, в метафазе сигнал был виден на всех хромосомах и центрических фрагментах хромосом в области прицентромерного хроматина. В анафазе прицентромерные районы по-прежнему были сильно фосфорилированы по гистону H3, однако в некоторых клетках на хроматидах, задерживающихся в экваториальной плоскости, сигнал не наблюдался. В телофазе фосфорилирование полностью исчезало. Исходя из полученных данных, авторы предположили, что отсутствие фосфорилирования гистона H3 связано с функциональными нарушениями центромерного района, что отражается на сегрегации хроматид в анафазе (Brasileiro-Vidal et al., 2005).

Роль киназ в регуляции фосфорилирования гистона H3

По сравнению с детальным анализом кандидатов киназ и других белков, связанных с модификациями гистона H3 у животных, существует мало сообщений касательно растений. К настоящему моменту у растений были клонированы только три консервативные киназы, Haspin, Aurora (включая AtAurora1, 2 и 3) и BRK1 (Wang et al., 2012; Zhang et al., 2014). Однако связь с pHH3Ser10 по-

казана только для Aurora и BRK1 киназ. Haspin-киназа арабидопсиса (*A. thaliana*) фосфорилирует гистон H3 по Thr3 и Thr11 (Kurihara et al., 2011).

Для *A. thaliana* в литературе описаны три гена Ser/Thr-протеинкиназ семейства Ауорога: *AtAurora1*, *AtAurora2* и *AtAurora3*, которые активно транскрибируются в тканях, содержащих множество делящихся клеток (Demidov et al., 2005, Kawabe et al., 2005). Специфичную локализацию рекомбинантных белков AtAuroga, меченных флюорохромом GFP, наблюдали на динамичных митотических структурах, микротрубочках веретена и центромерах, а также на формирующейся клеточной пластинке в делящихся ВУ-2 клетках табака (*N. tabacum*) (Demidov et al., 2005). С помощью ИФА было установлено совпадение сигналов локализации антител к AtAurora1 с pHH3Ser10 в центромерах метафазных хромосом растений *V. faba* (с большими хромосомами). Сигнал располагался в прицентромерной области между кинетохорами гомологичных хромосом, однако фосфорилирование захватывало небольшой участок плеч хромосом, где не детектировалась киназа Aurora1 (Demidov et al., 2005). Для AtAUR3 была показана центромерная локализация начиная с профазы митоза и до ранней анафазы в ВУ-2 клетках табака. В поздней анафазе сигнал локализации антител к AtAUR3 наблюдали по всей длине хромосом, что соответствовало митотической картине распределения фосфорилирования H3Ser10 (Kawabe et al., 2005).

Для растений связь киназ Ауорога с фосфорилированием H3Ser10 показана как *in vitro* (Demidov et al., 2005; Kawabe et al., 2005), так и *in vivo* (Kurihara et al., 2006). При анализе активности AtAuroga1 киназы *in vitro* Демидов с коллегами (Demidov et al., 2005) наблюдали преимущественное фосфорилирование гистона H3 по Ser10, но не по Ser28 или Thr3, 11 или 32. У растений арабидопсиса, кроме AtAUR1, киназную активность в отношении фосфорилирования H3Ser10 *in vitro* проявляли также AtAUR2 и AtAUR3 (Kawabe et al., 2005). При обработке клеток ВУ-2 табака гесперадином (hesperadin), который ингибирует Ауорога-киназу 3 *A. thaliana* (AtAUR3), были обнаружены снижение уровня pHH3Ser10 и pHH3Ser28, а также аномальная сегрегация митотических хромосом (Kurihara et al., 2006). У растений риса (*Oryza sativa*) для нормальной локализации Ауорога-киназы до начала метафазы I предположительно необходима киназа BRK1 (Bub1-related kinase 1) (Wang et al., 2012). Этот вывод авторы сделали исходя из двух характеристик мейоза у мутантов риса *brk-1*: во время диакинеза pHH3Ser10 в области центромеры отсутствует, а в метафазе I значительно снижается биполярное натяжение между кинетохорами гомологичных хромосом. Так как в первом и втором случаях необходимо нормальное функционирование Ауорога-киназы, то инактивация киназы BRK1, вероятно, вызывает аномальную локализацию Ауорога-киназы до начала метафазы I.

Дефосфорилирование, так же как и фосфорилирование, играет большую роль в клеточном цикле. Дефосфорилирование гистона H3 растений связано с аналогами фосфатаз PP2A (дефосфорилирует когезин, объединяясь в комплекс SGO-PP2A) и PP1 животных. У растений ячменя (*H. vulgare*), бобов (*V. faba*) и ржи (*S. cereale*) высокий уровень pHH3Ser10 вдоль плеч хромосом выяв-

ляли в митозе после обработки растений кантаридином, который является специфическим ингибитором фосфатаз, таких как PP2A и PP1 (Manzanero et al., 2002). Распределение сигнала pH3Ser10 при обработке кантаридином было аналогично картине фосфорилирования хромосом в первом делении мейоза у растений, однако отсутствие дефосфорилирования не приводило к серьезным нарушениям клеточного деления, поскольку среди анализируемых наблюдались клетки с нормальными анафазами и телофазами (Manzanero et al., 2002).

Для *A. thaliana* было доказано существование связи PP2A с дефосфорилированием pH3Ser10. Кроме того, для растений данного вида было установлено, что белки NRPs (NAP-родственные белки) являются потенциальными регуляторами дефосфорилирования pH3Ser10 (Biró et al., 2012). NRP_S – растительные ортологи белка SET/I₂^{PP2A}, который является ингибитором PP2A-опосредованного дефосфорилирования pH3Ser10 в клетках животных. Было показано, что NRP1 арабидопсиса ингибирует активность иммунопреципитированного PP2A *in vitro* и взаимодействует с каталитической субъединицей PP2A *in vivo* (Biró et al., 2012). Исходя из этих данных, можно предположить, что динамика фосфорилирования H3Ser10 в митозе растений связана с BRK1-опосредованной активностью киназы Aurora и NRP-контролируемой активностью фосфатазы PP2A.

Фосфорилирование гистона H3Ser10 у растений связано непосредственно с процессами деления клетки, так как оно не наблюдается в интерфазе, а начинается в профазе, достигает максимума в метафазе и исчезает в телофазе как в митозе, так и в обоих делениях мейоза. Небольшие отличия могут наблюдаться во времени начала фосфорилирования (ранняя или поздняя профазы), а также в активности дефосфорилирования (анафаза – телофаза). Для митоза и второго деления мейоза характерно фосфорилирование прицентромерных районов, а для первого деления мейоза – по всей длине хромосом. Однако у этой закономерности существует несколько исключений. Так, у растений с голоцентрическими хромосомами и мхов, а также в некоторых работах на арабидопсисе и табаке отмечали распространение фосфорилирования H3Ser10 на всю длину хромосом. Кроме того, у *C. strigilatum* pH3Ser10 наблюдали только в прицентромерной области как в первом, так и во втором делениях мейоза.

Несмотря на существенные различия в картине и незначительные отличия в динамике фосфорилирования хромосом, можно предположить, что фосфорилирование H3Ser10 для большинства растений тесно связано с когезией и функциональной активностью центромеры, которые в комплексе необходимы для правильной сегрегации хромосом в митозе и мейозе. Накопленные в настоящее время данные позволяют предположить, что фосфорилирование H3Ser10 связано с сегрегацией центромер гомологов в первом делении мейоза и сестринских центромер в митозе и во втором делении мейоза. Отсутствие сигналов pH3Ser10 во втором делении мейоза на задерживающихся В-хроматидах ржи и одиночных хроматидах гаплоидной пшеницы подтверждает данное предположение, поскольку деление хромосом произошло еще в мейозе I. Кроме того, для растений установ-

лена связь сегрегации сестринских центромер в митозе с Aurora-зависимым фосфорилированием H3Ser10.

Наличие разнящихся данных относительно фосфорилирования H3Ser10 на плечах хромосом позволяет сделать предположение, что функция данной модификации может отличаться у разных видов растений. Фосфорилирование плеч хромосом в мейозе, вероятнее всего, связано с когезией сестринских хроматид, необходимой для правильного разделения гомологичных хромосом. Наблюдаемое у видов с голоцентрическими хромосомами распространение pH3Ser10 на плечи хромосом связано с их морфологическими особенностями и относится к фосфорилированию прицентромерных областей. Возможно, у мхов и некоторых видов сосудистых растений фосфорилирование H3Ser10 сохранило связь с конденсацией хромосом, как у животных и инфузорий. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования в данной области. Кроме того, несмотря на большое количество работ, связанных с исследованием фосфорилирования H3Ser10, еще очень мало известно о белках, отвечающих за регуляцию его динамики у растений, что также требует дальнейшего изучения.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the Shared Access Center, SB RAS, for microscopic examination of biological objects.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-00679a, and State Contract 0324-2015-0005.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Biró J., Farkas I., Domoki M., Ötvös K., Bottka S., Dombrádi V., Fehér A. The histone phosphatase inhibitory property of plant nucleosome assembly protein-related proteins (NRPs). *Plant Physiol. Biochem.* 2012;52:162-168. DOI 10.1016/j.plaphy.2011.12.010
- Brasileiro-Vidal A.C., Brammer S., Puertas M.J., Zanatta A.C., Prestes A., Moraes-Fernandes M.I.B., Guerra M. Mitotic instability in wheat × *Thinopyrum ponticum* derivatives revealed by chromosome counting, nuclear DNA content and histone H3 phosphorylation pattern. *Plant Cell Rep.* 2005;24:172-178. DOI 10.1007/s00299-005-0913-4
- Cai X., Dong F., Edelmann R.E., Makaroff C.A. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *J. Cell Sci.* 2003;116(14):2999-3007. DOI 10.1242/jcs.00601
- Caperta A.D., Rosa M., Delgado M., Karimi R., Demidov D., Viegas W., Houben A. Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet. Genome Res.* 2008;122:73-79. DOI 10.1159/000151319
- Cobb J., Miyaike M., Kikuchi A., Handel M.A. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase IIa localization and chromosome condensation. *Chromosoma.* 1999;108:412-425. DOI 10.1007/s004120050393
- Demidov D., Schubert V., Kumke K., Weiss O., Karimi-Ashtiyani R., Buttler J., Heckmann S., Wanner G., Dong Q., Han F., Houben A. Antiphosphorylated histone H2AThr120: a universal microscopic marker for centromeric chromatin of mono- and holocentric plant species. *Cytogenet. Genome Res.* 2014;143:150-156. DOI 10.1159/000360018
- Demidov D., VanDamme D., Geelen D., Blattner F.R., Houben A. Identification and dynamics of two classes of Aurora-like kinases

- in Arabidopsis and other plants. *Plant Cell*. 2005;17:836-848. DOI 10.1105/tpc.104.029710
- Dong Q., Han F. Phosphorylation of histone H2A is associated with centromere function and maintenance in meiosis. *Plant J*. 2012;71:800-809. DOI 10.1111/j.1365-313X.2012.05029.x
- Feitoza L., Guerra M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica*. 2011;139:305-314. DOI 10.1007/s10709-011-9550-8
- Fernandes T., Yuyama P.M., Moraes A.P., Vanzela A.L. An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. *Genome*. 2008;51(9):772-777. DOI 10.1139/G08-042
- Fuchs J., Demidov D., Houben A., Schubert I. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends Plant Sci*. 2006;11(4):199-208. DOI 10.1016/j.tplants.2006.02.008
- Gao Z., Fu S., Dong Q., Han F., Birchler J.A. Inactivation of a centromere during the formation of a translocation in maize. *Chromosome Res*. 2011;19:755-761. DOI 10.1007/s10577-011-9240-5
- Gernand D., Demidov D., Houben A. The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. *Cytogenet. Genome Res*. 2003;101:172-176. DOI 10.1159/000074175
- Guerra M., Brasileiro-Vidal A.C., Arana P., Puertas M.J. Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica*. 2006;126:33-41. DOI 10.1007/s10709-005-1430-7
- Guo X.W., Th'ng J.R.H., Swank R.A., Anderson H.J., Tudan C., Bradbury E.M., Roberge M. Chromosome condensation induced by fosciciccin does not require p34Cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *EMBO J*. 1995;14(5):976-985.
- Han F., Gao Z., Birchler J.A. Reactivation of an inactive centromere reveals epigenetic and structural components for centromere specification in maize. *Plant Cell*. 2009;21:1929-1939. DOI 10.1105/tpc.109.066662
- Han F., Lamb J.C., Birchler J.A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006;103:3238-3243. DOI 10.1073/pnas.0509650103
- Henzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D. Mitosis specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106:348-360. DOI 10.1007/s004120050256
- Houben A., Demidov D., Caperta A.D., Karimi R., Agueci F., Vlasenko L. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Bioch. Biophys. Acta*. 2007;1769:308-315. DOI 10.1016/j.bbaexp.2007.01.002
- Houben A., Demidov D., Ruttana T., Scheidtmann K.H. Novel phosphorylation of histone H3 at threonine 11 that temporally correlates with condensation of mitotic and meiotic chromosomes in plant cells. *Cytogenet. Genome Res*. 2005;109:148-155. DOI 10.1159/000082394
- Houben A., Wako T., Furushima-Shimogawara R., Presting G., Kunzel G., Schubert I., Fukui K. Short communication: the cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J*. 1999;18:675-679.
- Ito T. Role of histone modification in chromatin dynamics. *J. Biochem*. 2007;141:609-614. DOI 10.1093/jb/mvm091
- Kaszas E., Cande W.Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell Sci*. 2000;113:3217-3226.
- Kawabe A., Matsunaga S., Nakagawa K., Kurihara D., Yoneda A., Hasezawa S., Uchiyama S., Fukui K. Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol*. 2005;58:1-13. DOI 10.1007/s11103-005-3454-x
- Kurihara D., Matsunaga S., Kawabe A., Fujimoto S., Noda M., Uchiyama S., Fukui K. Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J*. 2006;48:572-580. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02893.x
- Kurihara D., Matsunaga S., Omura T., Higashiyama T., Fukui K. Identification and characterization of plant Haspin kinase as a histone H3 threonine kinase. *BMC Plant Biol. Database*. 2011. DOI 10.1186/1471-2229-11-73
- Li Y., Butenko Y., Graf G. Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells. *Plant J*. 2005;41:346-352. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02301.x
- Manzanero S., Arana P., Puertas M.J., Houben A. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma*. 2000;109:308-317. DOI 10.1007/s004120000087
- Manzanero S., Rutten T., Kotscherba V., Houben A. Alterations in the distribution of histone H3 phosphorylation in mitotic plant chromosomes in response to cold treatment and the protein phosphatase inhibitor cantharidin. *Chromosome Res*. 2002;10:467-476. DOI 10.1023/A:1020940313841
- Marcon-Tavares A.B., Felinto F., Feitoza L., Barros e Silva A.E., Guerra M. Different patterns of chromosomal histone H3 phosphorylation in land plants. *Cytogenet. Genome Res*. 2014;143:136-143. DOI 10.1159/000364815
- Oliver C., Pradillo M., Corredor E., Cunado N. The dynamics of histone H3 modifications is species-specific in plant meiosis. *Planta*. 2013;238:23-33. DOI 10.1007/s00425-013-1885-1
- Paula C.M.P., Techio V.H., Souza Sobrinho F., Freitas A.S. Distribution pattern of histone H3 phosphorylation at serine 10 during mitosis and meiosis in *Brachiaria* species. *J. Genetics*. 2013;92(2):259-266. DOI 10.1007/s12041-013-0261-z
- Pedrosa A., Jantsch M.F., Moscone E.A., Ambros P.F., Schweizer D. Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). *Chromosoma*. 2001;110:203-213. DOI 10.1007/s004120000125
- Schroeder-Reiter E., Houben A., Wanner G. Immunogold labeling of chromosomes for scanning electron microscopy: A closer look at phosphorylated histone H3 in mitotic metaphase chromosomes of *Hordeum vulgare*. *Chromosome Res*. 2003;11:585-596. DOI 10.1023/A:1024952801846
- Sveshnikov P.G., Malaytsev V.V., Bogdanova I.M., Solopova O.N. Vvedenie v molekulyarnuyu immunologiyu i gibridomnyuyu tekhnologiyu [Introduction into Molecular Immunology and Hybridoma Technology]. Moscow, Moscow State Univ. Publ., 2006.
- Wallace W., Schaefer L.H., Swedlow J.R. Artifacts and aberrations in deconvolution analysis. Olympus Microscopy Resource Center. 2012. available at <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/deconvolution/deconartifacts.html>
- Wang F., Higgins J.M.G. Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks. *Trends Cell Biol*. 2013;23(4):175-184. DOI 10.1016/j.tcb.2012.11.005
- Wang W., Tang D., Luo Q., Jin Y., Shen Y., Wang K., Cheng Z. BRK1, a Bub1-related kinase, is essential for generating proper tension between homologous kinetochores at metaphase I of rice meiosis. *Plant Cell*. 2012;24:4961-4973. DOI 10.1105/tpc.112.105874
- Wei Y., Mizzen C.A., Cook R.G., Gorovsky M.A., Allis D.C.D. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998;95:7480-7484.
- Wei Y., Yu L., Bowen J., Gorovsky M.A., Allis C.D. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*. 1999;97:99-109. DOI 10.1016/S0092-8674(00)80718-7
- Zhang B., Dong Q., Su H., Birchler J.A., Han F. Histone phosphorylation: its role during cell cycle and centromere identity in plants. *Cytogenet. Genome Res*. 2014;143:144-149. DOI 10.1159/000360435
- Zhang B., Lv Z., Pang J., Liu Y., Guo X., Fu S., Li J., Dong Q., Wu H-J., Gao Z., Wang X-J., Hana F. Formation of a functional maize centromere after loss of centromeric sequences and gain of ectopic sequences. *Plant Cell*. 2013;25:1979-1989. DOI 10.1105/tpc.113.110015

Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асцита Кребс-2 и различные формы трансплантатов

Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.М. Минкевич¹, Я.Р. Ефремов^{1,2}, О.С. Таранов³, В.В. Омигов³, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, А.С. Проскурина¹, Е.И. Верещагин⁴, А.В. Козел^{1,2}, В.А. Рогачев¹, Д.Б. Петров⁵, А.А. Останин⁶, Е.Р. Черных⁶, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

⁵ Общество с ограниченной ответственностью торговый дом «Терморобот», Новосибирск, Россия

⁶ Институт клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

В настоящее время считается доказанным существование в массе опухолевых клеток стволовых раковых клеток, обуславливающих прогрессию опухоли и ее устойчивость ко многим химиотерапевтическим цитостатикам. Предлагаемая работа является первой в цикле статей, характеризующих разработку стратегии противораковой терапии, основанной на элиминации стволовых раковых клеток. В исследовании охарактеризовано циторедукующее действие инъекций циклофосфана (ЦФ), двуцепочечной ДНК (дцДНК) и их сочетания на популяцию туморогенных клеток асцитной опухоли Кребс-2 (стволовые инициирующие раковые клетки, СИРК) мыши. Оценен перевивочный потенциал раковых клеток Кребс-2, обрабатываемых *in vivo* в мышцах-асцитоносах линии СВА, с последующей перевивкой обработанных клеток в форме солидного графта реципиентным мышам той же линии. Данные по перевивке обработанного ЦФ и ДНК асцита Кребс-2 позволяют предположить, что СИРК можно полностью элиминировать из развитого асцита. Показано, что клетки, интернализирующие дцДНК и одновременно позитивные по CD34, более чувствительны к синергичному воздействию ЦФ и препаратов дцДНК. Обработка асцита Кребс-2 ДНК человека в интервал времени 1–12 ч после инъекции ЦФ элиминирует клетки, захватывающие TAMRA-меченую ДНК (СИРК), или меняет их функциональное состояние, что сопровождается исчезновением поверхностного маркера CD34. Установлено, что 18 ч после введения ЦФ является переломной точкой репаративного процесса, разделяющей его на два временных отрезка: NER (nucleotide excision repair, эксцизионная репарация нуклеотидов) + процессинг двуцепочечных концов и гомологическую рекомбинацию (ГР). Оба временных интервала могут быть эффективно использованы для разрушения туморогенного потенциала трансплантата. ЦФ в виде монопрепарата оказывает наиболее эффективное редуцирующее действие на развитие асцитного трансплантата в режиме нескольких инъекций. Для достижения максимальной эффективности время повторного введения цитостатика должно накладываться на время достижения раковыми клетками фазы G1-S, находящимися при первой инъекции ЦФ в фазе G2-M, и (или) на время активной фазы ГР.

Ключевые слова: двуцепочечная ДНК; циклофосфан; асцит Кребс-2; стволовые инициирующие раковые клетки; NER; гомологическая рекомбинация; перевивочный потенциал.

Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants

E.A. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.M. Minkevich¹, Ya.R. Efremov^{1,2}, O.S. Taranov³, V.V. Omigov³, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, A.S. Proskurina¹, E.I. Vereschagin⁴, A.V. Kozel^{1,2}, V.A. Rogachev¹, D.B. Petrov⁵, A.A. Ostanin⁶, E.R. Chernykh⁶, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ The State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

⁵ LLC «Termorobot» Novosibirsk, Russia

⁶ Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

The existence of a small subset of cancer cells referred to as tumor initiating stem cells (TISCs) largely responsible for tumor progression and resistance to chemotherapeutic cytostatic drugs represents a recent important paradigm shift. The present work is the first report in a series of papers from our group where we describe the development of anticancer therapy based on the selective targeting of TISCs. Here we characterize a cytoreductive activity of cyclophosphamide (CP), double-stranded DNA (dsDNA) and their combinations against the TISC population present in mouse Krebs-2 ascites. We evaluated the engraftment potential of Krebs-2 cancer cells treated in ascites-bearing mice *in vivo*, followed by re-engraftment to congenic recipient mice in the form of a solid graft. These data indicate that, with our approach, TISCs can be completely eliminated even from a well-established ascites. We demonstrate that dsDNA-internalizing and CD34-positive cells are more sensitive to the synergistic

effects of CP and dsDNA. Treatment of Krebs-2 ascites with human DNA at hours 1–12 post CP injection results in either elimination of cells that internalize TAMRA-labeled DNA (TISCs) or alterations in their phenotype, which is accompanied by the loss of surface expression of CD34. Next, we show that the timepoint 18 hrs post CP treatment is critical to the ongoing repair process in that it divides the repair into two phases: nucleotide excision repair + dsDNA break repair and homologous recombination. Importantly, both of these phases can be conveniently used for targeting the tumorigenic potential of the graft. In the context of monotherapy, CP is most effective against ascites grafts when administered as serial injections. To achieve maximum efficacy, the timing of consecutive injections must match the time when cancer cells found at G2-M during the first injection enter G1-S and/or the time of active repair via homologous recombination.

Key words: double-stranded DNA; cyclophosphamide; Krebs-2 ascites; tumor-initiating cancer stem cells; NER; homologous recombination; engraftment potential.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., Ефремов Я.Р., Таранов О.С., Омигов В.В., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Верещагин Е.И., Козел А.В., Рогачев В.А., Петров Д.Б., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асцита Кребс-2 и различные формы трансплантатов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Efremov Ya.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kozel A.V., Rogachev V.A., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116

В наших предыдущих работах было показано, что как предварительные обработки животных цитостатиком циклофосфаном (ЦФ) и препаратом двуцепочечной ДНК (дцДНК), так и инъекции этих препаратов животным с уже привитыми солидными опухолями приводят к достоверному торможению роста экспериментальных злокачественных опухолей Кребс-2, LS, RLS (Алямкина и др., 2009, Alyamkina et al., 2009, 2010). Целью настоящего цикла исследований являлась разработка режима синергичного противоракового действия цитостатика ЦФ и препарата дцДНК в терапии асцитного рака мышей Кребс-2. Доставка терапевтических агентов, в частности препаратов дцДНК, в солидные опухоли затруднена ввиду слабой васкуляризации тканей. В связи с этим в настоящем цикле работ в качестве модельной опухоли использовали асцитную форму карциномы Кребс-2 мыши. Эта злокачественная опухоль слабо иммуногенна, не дает метастазов и является линейнонеспецифичной, что позволяет перевивать ее разным линиям мышей. Цитостатик ЦФ выбрали как базовый, широко применяемый в программной полихимиотерапии алкилирующий агент, индуцирующий межцепочечные сшивки (МЦС) ДНК в активно делящихся клетках опухоли.

Злокачественный (малигнизированный) асцит – это патологическое накопление жидкости в брюшной или плевральной полости, развивающееся вследствие опухолевого поражения брюшины или легких. Малигнизированный асцит наиболее часто развивается при раке молочной железы, яичников, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки. Асцитная форма рака относится к неизлечимым заболеваниям и характеризует терминальную стадию раз-

вития болезни. В терапии асцитных форм рака используются несколько поддерживающих общепринятых способов, позволяющих улучшить «качество» жизни паллиативных пациентов (Блохин, Переводчикова, 1984; Лайт, 1986; Brenner, 1986; Стенина, 2006; Беспалов и др., 2013).

Разработка терапевтического режима, при котором происходит эрадикация асцитного рака, приводящего к полному излечению экспериментальных животных, могло бы значить, что произошел качественный скачок в терапии рака.

В работах (Dolgova et al., 2013, 2014) описано два явления, имеющих, по всей видимости, общебиологическое значение. Установлено, что низкодифференцированные клетки различного генеза, включая стволовые иницирующие раковые клетки (СИРК), способны естественным путем интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК. Эти фрагменты, находясь в клетке во время процесса репарации межцепочечных сшивок, индуцированных действием ЦФ, интерферируют репаративный процесс таким образом, что перевиваемый графт экспериментальной опухоли Кребс-2 мыши теряет туморогенные свойства. Механизм интернализации фрагментов дцДНК в клетки к настоящему моменту не выяснен и представляет интерес для дальнейших исследований.

Первоначальной задачей настоящей работы была оценка циторедукрующего воздействия ЦФ и препаратов ДНК на СИРК, характеризующиеся захватом TAMRA-меченой ДНК, с использованием дополнительного маркера этих клеток CD34 (Dolgova et al., 2014).

Для характеристики режимов противоракового действия ЦФ и препаратов дцДНК мы оценивали тумороген-

ный перевивочный потенциал раковых клеток Кребс-2, обработанных *in vivo* в мышах-асцитносах, путем перевивки таких клеток в виде солидных аллогенных трансплантатов реципиентным мышам той же линии. В работе протестировали различные режимы перевивки и количества перевиваемых клеток. Дополнительно охарактеризовали терапевтическое действие различных режимов введения ЦФ в виде монопрепарата мышам-асцитносам.

Материалы и методы

Подробная информация о методах исследования, экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося (препарат ДНК лосося получали аналогичным образом из молок лосося), подготовке кросс-линкированного нитроген-мустардом препарата ДНК представлена в статье Alyamkina et al., 2015.

Введение препаратов циклофосфана и экзогенной ДНК

Цитостатик циклофосфан вводили мышам внутривентриально (в/б) в дозе 100–200 мг/кг массы тела в зависимости от эксперимента. Препараты фрагментированной ДНК (hDNA и ssDNA) и ДНК, обработанной нитроген-мустардом (ICL-hDNA и ICL-ssDNA), вводили в/б в дозе 0,5–1 мг на инъекцию ежедневно или каждые два часа (суммарно по 6 мг ДНК на мыш). Временные интервалы введения препаратов либо описали непосредственно в тексте, либо изобразили схематически на соответствующих рисунках (например, рис. 5).

Определение количества CD34+ клеток в асцитной форме опухоли Кребс-2 при помощи проточной цитометрии и микроскопического анализа

Клетки асцита Кребс-2 отбирали у животных после соответствующих обработок, промывали раствором PBS и осаждали при 400 g в течение 5 мин при 4 °С. После осаждения центрифугированием клетки ресуспендировали в PBS с 0,1 % NaN₃, 1 % FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, США) и подсчитывали в камере Горяева. К 1 млн клеток добавляли 4 мкг антител (FITC Rat anti-Mouse CD34, BD Pharmingen, США), 4 мкг изотип-контроля (FITC Rat IgG2a, Isotype Control, BD Pharmingen, США) и инкубировали в течение 40 мин при 4 °С в 200 мкл среды. Далее долю CD34+ клеток (%) определяли двумя способами. Первый: при помощи проточного цитофлюориметра BD FACSAria относительно результатов изотип-контроля в каждом образце. Второй: обработанные указанным выше способом клетки асцита Кребс-2 промывали PBS, наносили цитоспином на предметное стекло (1 000 об/мин в течение 1 мин), на полученный препарат наносили ~10 мкл Antifade DABCO, накрывали покровным стеклом и анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Axioskop 2 Plus (Zeiss) с использованием программы AxioVision.

Мечение ДНК флуорохромом TAMRA

Метод мечения ДНК флуорохромом TAMRA в реакции ПЦР подробно описан в статье (Dolgova et al., 2014).

Анализ перевивочного потенциала клеток асцита Кребс-2, обработанных *in vivo*

Мыши с развитым асцитом Кребс-2 (4–7 сут после прививки) получали инъекции цитостатика ЦФ (100–200 мг/кг) и препаратов ДНК (суммарно по 6 мг по схеме, приведенным в каждом конкретном эксперименте). В определенный интервал времени после проведенных обработок у животных отбирали асцитную жидкость, из нее при 400 g осаждали клетки в течение 5 мин при 4 °С, подсчитывали их в камере Горяева и перевивали в 100 мкл среды RPMI-1640 или PBS в заднюю правую лапу интактных животных. Количество перевиваемых клеток в экспериментах варьировали. Животным контрольных групп перевивали аналогичное количество клеток асцита Кребс-2, не подвергнутого обработкам.

Анализ перевивочного потенциала клеток асцита Кребс-2, обработанных *ex vivo* препаратом ДНК и находящимся под воздействием циклофосфана

Отличие настоящего подхода от предыдущего заключается в том, что экспериментальным животным одновременно прививали клетки асцита Кребс-2 в количестве, соответствующем количеству клеток, содержащихся в четырехсуточном асците, развившемся в мышши после прививки 2 млн клеток (~200 млн клеток).

Мышь с заранее привитым развитым асцитом получала инъекцию ЦФ в дозе 100 мг/кг. Через 18 ч у нее отбирали асцитную жидкость, клетки осаждали при 400 g в течение 5 мин и подсчитывали в камере Горяева. Далее эти клетки соединяли со смесью препаратов ICL-ssDNA/ssDNA (3/5) из расчета 0,5 мг/мышь и прививали по 200 млн клеток экспериментальным животным, получившим также предварительную инъекцию ЦФ (100 мг/кг) за 18 ч до прививки асцита. После этого мыши получили инъекции аналогичной дозы смеси препаратов ДНК еще 11 раз (режим 18–30 ч). В тексте группа обозначена как «ЦФ+асцит (через 18 ч после ЦФ)+ssDNAmix (18–30)».

Анализ доставки TAMRA-меченой ДНК в клетки асцита Кребс-2

Клетки асцита Кребс-2 отбирали у мыши и осаждали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин при 4 °С и промывали средой RPMI-1640 один раз. Затем клетки подсчитывали в камере Горяева. Инкубировали 1 млн клеток в 200 мкл этой же среды с 10 или 1 000 нг TAMRA-меченой ДНК в течение часа при комнатной температуре. Затем клетки осаждали центрифугированием, промывали небольшим количеством среды и осадок ресуспендировали в конечном объеме среды. Далее количество клеток, захвативших TAMRA-меченую ДНК, анализировали при помощи проточного цитофлюориметра BD FACSAria (Becton Dickinson, США). При этом процент TAMRA+ клеток, т.е. клеток, инкубируемых в среде без добавления TAMRA-меченой ДНК, оценивали относительно контроля.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel, на рисунках отображено стандартное отклонение. Сравнение групп животных по

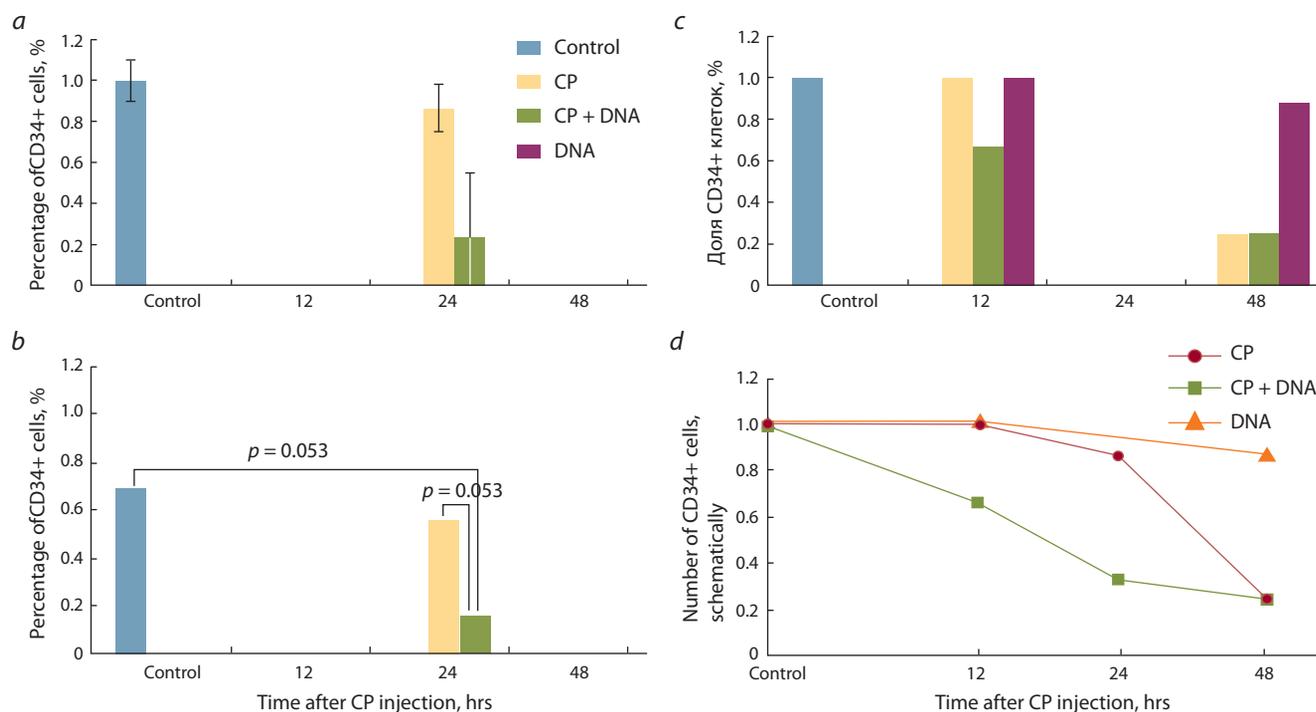


Fig. 1. Quantification of CD34+ cell dynamics in Krebs-2 mouse ascites treated with CP and/or dsDNA.

Groups: CP, single CP injection (200 mg/kg); CP+DNA, CP injection (200 mg/kg) followed by 12 human DNA injections (hourly, 0.5 mg/injection); DNA, 12 human DNA injections (hourly, 0.5 mg/injection); Control, intact ascites. 0: starting timepoint (CP or first dsDNA injection). (a) FACS analysis of Krebs-2 ascites engrafted into mice. The percentage of CD34+ cells was measured before (control) and 24 hours after the treatment with CP or CP+dsDNA; (b) Quantification of CD34+ cell percentage in Krebs-2 ascites from mice (control and 24 hrs after CP, CP+DNA, and DNA injections) as assayed by fluorescence microscopy; (c) FACS analysis of CD34+ cells in Krebs-2 engrafted mice treated with CP or CP+DNA (12 and 48 h timepoints) and in untreated ascites-bearing mice (control); (d) Schematic plot of CD34+ cell dynamics measured over two days after CP, CP+dsDNA or dsDNA injections. Three independent experiments shown in (a-c) are summarized.

продолжительности жизни проводили методом непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни в программе Statistica (Стэнфорд, США).

Результаты и обсуждение

Эффект воздействия обработки циклофосфаном и циклофосфаном + ДНК на асцитные CD34+ клетки

Одним из первостепенных вопросов, касающихся воздействия ЦФ и дцДНК на СИРК, был вопрос эффективности элиминации СИРК, захватывающих дцДНК и находящихся под воздействием ЦФ, в режиме монопрепаратов и в их синергичном действии.

Были проведены эксперименты по оценке воздействия двух препаратов на клетки асцита Кребс-2, способные интернализировать фрагменты дцДНК, с использованием CD34, дополнительного маркера этих клеток. Как было показано в работе (Dolgova et al., 2014), популяция клеток, способных интернализировать TAMRA-меченую ДНК, на 40 % перекрывается с популяцией клеток, несущих маркер CD34 (причем от 40 до 90 % CD34+ клеток являются TAMRA-позитивными). Если при проведенных обработках будет обнаружено снижение числа CD34+ клеток, то этот факт может с определенной долей вероятности означать, что произошла элиминация или TAMRA+СИРК, или

поверхностного CD34 маркера. Однако нельзя исключить возможность воздействия указанных обработок на CD34+ клетки, не способные захватывать TAMRA-меченую ДНК, что подразумевает относительность указанной оценки. Мы провели несколько экспериментов по оценке изменения числа CD34+ клеток в обработанном асците. Результаты одного из экспериментов с использованием человеческой дцДНК в режиме 1–12 ч после введения животным с привитым асцитом ЦФ представлены на рис. 1.

При анализе полученных результатов можно сделать следующие выводы. К 48 ч обработка *in vivo* асцита как ЦФ, так и его сочетанием с препаратом дцДНК человека приводит к снижению количества CD34+ клеток до значения 0,2 % (рис. 1, в, ЦФ, ЦФ+ДНК, ДНК). Полного исчезновения этого типа клеток не происходит. На отрезке времени 0–48 ч обнаружена разница в динамике изменения количества CD34+ клеток при обработке одним ЦФ и ЦФ+дцДНК человека (рис. 1, а, б, в, ЦФ, ЦФ+ДНК). Можно отметить более выраженное снижение количества CD34+ клеток в случае обработки ЦФ+ДНК по сравнению с действием одного ЦФ (рис. 1, г, ЦФ, ЦФ+ДНК). Такая картина могла означать, что более сильное воздействие на этот тип клеток оказывает совместная обработка ЦФ и дцДНК и что клетки, интернализирующие дцДНК и одновременно позитивные по CD34, более чувстви-

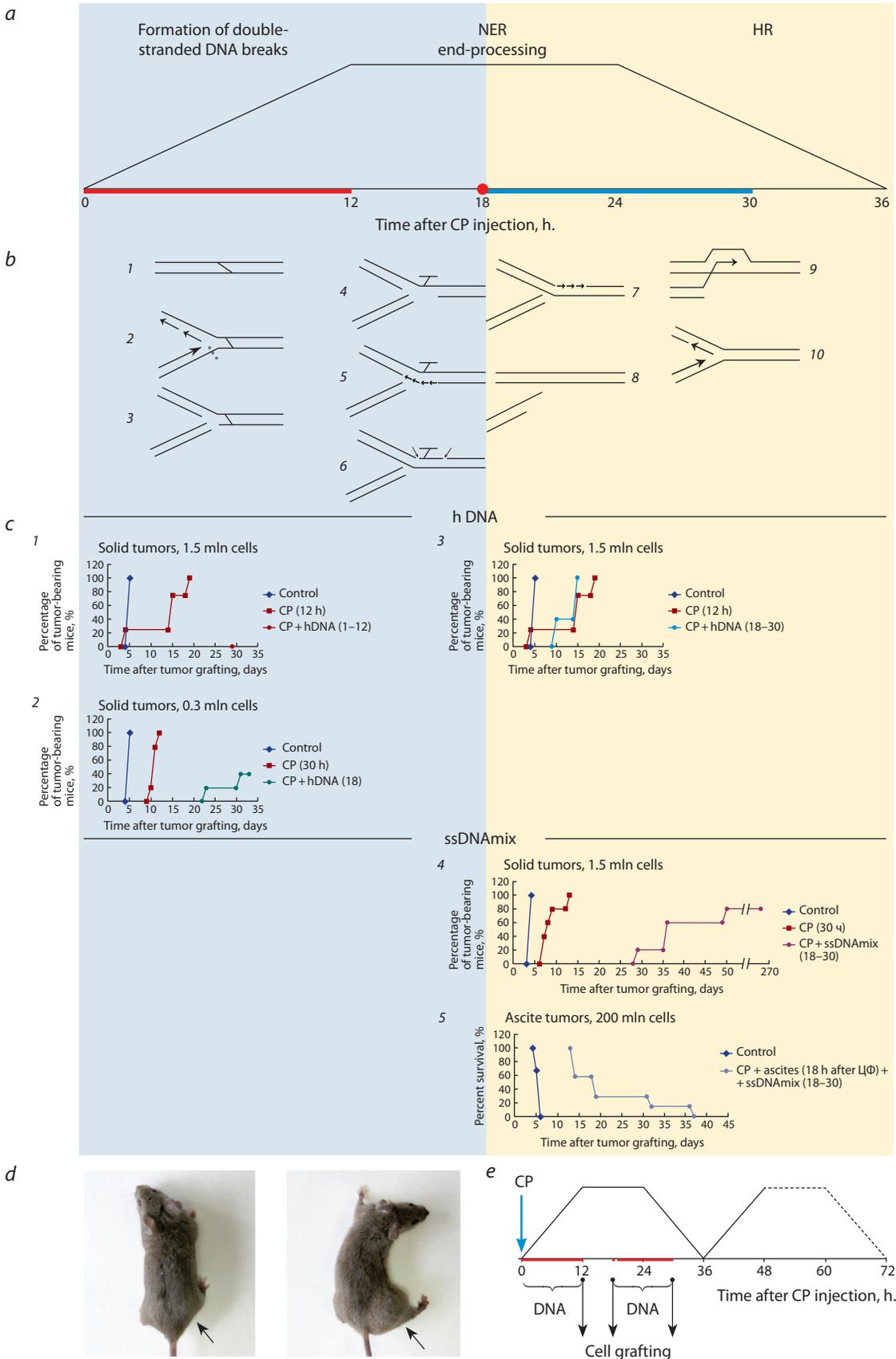


Fig. 2. Anticancer effect of combined CP + dsDNA treatments correlated with the stage of the repair of inter-strand crosslinks induced by CP in the ascites form of the Krebs-2 tumor.

тельны к такому воздействию. Общий вывод следующий. Обработка асцита Krebs-2 препаратом ДНК человека в режиме 1–12 ч на фоне воздействия ЦФ или элиминирует TAMRA+ клетки, или меняет их функциональное состояние, что в обоих случаях сопровождается исчезновением клеток, несущих поверхностный маркер CD34.

Влияние синергичного действия циклофосфана и препаратов дцДНК человека и лосося в режиме 1–12, 18, 18–30 (часов после введения циклофосфана) на перевивочный потенциал асцитных клеток Krebs-2

Для оценки биологического эффекта синергичного воздействия ЦФ и ЦФ+ДНК, которое подразумевало элиминацию TAMRA+ клеток (СИРК, характеризующихся захватом TAMRA-меченой ДНК) или изменение их функционального состояния, нами были проведены эксперименты по перевивке в форме солидного трансплантата мышам той же линии обработанных непосредственно в асците раковых клеток. Такая тактика была связана с тем, что в начале исследования (Alyamkina et al., 2015) в экспериментах использовали асцит в возрасте старше 7 сут от перевивки и после обкола ЦФ и препаратом дцДНК наблюдали тотальную гибель мышей. Причины токсического воздействия обработок были неизвестны. Как показали дальнейшие эксперименты, одновременное апоптотическое разрушение массы асцитных клеток, составляющей для асцита такого возраста несколько миллиардов, и связанные с этим патологические последствия (вторичный некроз, разрушение кишечного эпителия, системная воспалительная реакция, сепсис, коллапс иммунной системы), вызванные проведенными обработками, явились причиной смертельного токсического эффекта (Alyamkina et al., 2015). Скоротечная гибель мышей и возможность длительного нахождения (до 14 сут) молекул ДНК в реципиентной клетке (Dolgova et al., 2012) не позволяли оценить состояние TAMRA+ клеток у мышей-асцитиносов, которым вводили препарат дцДНК.

Ниже приводятся результаты применения нескольких режимов, при которых обрабатывали зрелый (> 7 сут) асцит. Использованные режимы введения препаратов проиллюстрированы для каждого конкретного эксперимента. Асцит *in vivo* обрабатывали препаратами нативной человеческой дцДНК в режиме ЦФ+ДНК (1–12), ЦФ+ДНК (18–30) или ЦФ+ДНК (18) и ДНК лосося в смеси кросс-линкированной дцДНК/дцДНК (2–3/5)

в режиме ЦФ+ДНК (18–30), после чего выделенные асцитные клетки перевивали в виде солидного трансплантата мышам той же линии. Для понимания общей картины происходящих событий сравнивали как уже опубликованные результаты (Dolgova et al., 2014), так и новые экспериментальные данные.

В проведенных исследованиях удалось полностью лишить клетки асцита туморогенного начала и добиться длительного по сравнению с контролем промежутка времени приживаемости или полной неприживаемости трансплантата, сформированного такими клетками.

Полученные результаты свидетельствуют:

1. В синергизме с ЦФ в фазе репарации NER (1–12 ч после введения ЦФ) при интерференции процесса репарации МЦС фрагментами дцДНК человека, попавшими в СИРК, последние теряют жизнеспособность или изменяют свой функциональный статус. Перевивка 40–50-кратного избытка клеток не приводит к развитию солидного трансплантата (рис. 2, в1). Также установлен факт, что единственная инъекция дцДНК человека через 18 ч после введения ЦФ разрушает туморогенный потенциал перевиваемого графта в количестве 300 тыс. клеток у трех из пяти опытных животных (рис. 2, в2). Опухоль не появилась после 60 дней наблюдения.
2. В рассматриваемой серии экспериментов было отмечено следующее противоречие. В синергизме с ЦФ в фазе репарации гомологичной рекомбинации (ГР) (в 18–30 ч после введения ЦФ) при интерференции процесса репарации межпочечных шивок фрагментами дцДНК человека, попавшими в СИРК, корректность репаративного процесса сохраняется и СИРК выживают более эффективно, чем при действии одного ЦФ (рис. 2, в3). Происходит стимуляция развития солидного трансплантата, который приживается в 100 % перевивочных экспериментов (Dolgova et al., 2014; Alyamkina et al., 2015).
3. В синергизме с ЦФ в фазе репарации ГР (18–30 ч после введения ЦФ) при использовании смеси кросс-линкированной дцДНК/ДНК лосося (2/5) происходят события, интерферирующие процесс репарации таким образом, что разрушается туморогенный потенциал прививаемого солидного трансплантата. В проведенном эксперименте у одной из пяти мышей солидный трансплантат не сформировался к 270-му дню наблюдения (рис. 2, в4). У остальных мышей трансплантат формировался последовательно, в зависимости от

Data on the plots are compared with the control and treatment with CP alone. (a) Schematic presentation of the stages of the repair process in Krebs-2 ascites cells (black curve) overlaid with the dsDNA injection regimen (red bars for human DNA and blue, for the 3:5 mix of native: crosslinked salmon sperm DNA); (b) Inter-strand crosslink repair intermediates arranged according to the time when the double-stranded DNA breaks were formed and repaired: 1, the nascence of an inter-strand crosslink; 2, the replication fork halts at the lesion; 3, 4, the NER machinery is recruited to the lesion, and a double-stranded break is formed; 5, DNA adduct translocation and repair synthesis of the leading DNA strand (TLS polymerase-mediated or on the homologous template); 6, the second step of NER, DNA adduct excision; 7, repair synthesis of the lagging DNA strand; 8, 3'-end processing of the double-strand break; 9, 10, invasion of the processed 3'-end of the double-stranded break into the homologous region of DNA, The replication fork is re-established; (c) 1, 2, 3, 4, the time course of tumor emergence after intramuscular injection of tumor cells treated *in vivo* with CP and dsDNA. Numbers of injected cells are indicated above the plot; 5, the time course of death of experimental animals engrafted with the ascites form of the Krebs-2 tumor after the treatments. The number of cells used for injections is indicated above the plot. 1–3, injection of human DNA; 4, 5, injection of salmon sperm DNA mix (ssDNAmix); c1, c3 reproduce the data, published in (Dolgova et al., 2014, Fig. 5A); c5 is described in more detail in (Potter et al., 2015b). (d) Left: mouse from the CP + ssDNAmix(18–30) group (Fig. 2, c4, line CP + ssDNAmix(18–30)) that never developed a tumor 270 days post engraftment; right: mouse from a control group on day 20 following egraftment. Arrows point to the graft injection site. (e) Experimental design outline showing the timepoints when mice received CP or CP + dsDNA and when treated tumor cells were re-engrafted to healthy animals as solid grafts.

степени сохранившегося туморогенного потенциала, на протяжении длительного промежутка времени. В этом случае наблюдается ярко выраженное количественное изменение признака (разрушение способности индуцировать развитие новой опухоли).

4. В синергизме с ЦФ в фазе репарации ГР (18–30 ч после введения ЦФ) при использовании смеси кросс-линкированная дцДНК/ДНК лосося (3/5) при первичной *ex vivo* обработке асцитных клеток происходят события, interfering процесс репарации так, что при этом в значительной степени редуцируется туморогенный потенциал прививаемого асцитного трансплантата (рис. 2, в5). В анализируемом эксперименте количество привитых клеток составляло 200 млн, что соответствовало четырехсуточному асциту. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных в четыре раза превысила этот показатель в контрольной группе, в которой мыши погибли на 4–6-е сутки после прививки асцита. В экспериментальной группе у 70 % животных асцит развивался последовательно и медленно, и эти мыши погибли к 19-м суткам эксперимента. Одна мышь погибла без каких-либо признаков асцита. У двух мышей вторичный асцит не развивался до 27-го дня от введения обработанного графта. У одного из этих животных к 24-му дню от начала эксперимента в месте введения иглы сформировался солидный трансплантат в форме нескольких подкожных узлов, повторяющих путь движения иглы. Максимальная продолжительность жизни одной мыши составила 42 дня.

Полученные данные позволили предположить, что обработки разными препаратами дцДНК и при разных режимах введения могут приводить к одному и тому же результату – полной эрадикации в обработанном асците или полному изменению функционального ракового статуса всех СИРК, что сопровождается потерей или значительным снижением туморогенного потенциала прививаемого графта. Одновременно существовала схема обработок, стимулирующая развитие опухоли. На рис. 2 представлены выборочные сравнительные результаты экспериментов, демонстрирующие режимы терапии ЦФ и препаратами дцДНК, позволяющие полностью или частично разрушить туморогенный потенциал прививаемого асцита или сохранить жизнеспособность СИРК и тем самым оказать стимулирующее действие на развитие перевитого графта.

Важно отметить, что обработка асцита только TAMRA-меченой ДНК не приводила к какому-либо значимому эффекту. При этом СИРК асцита Кребс-2 также интернализировали TAMRA-меченую ДНК. Этот факт мог означать, что разрушение СИРК или их функций: а) никак не связано с активацией иерархических киназ и арестом клеточного цикла, как это описано для случаев появления внутри клетки двуцепочечных концов экстраклеточных фрагментов (см. Лихачева и др., 2008); б) может быть связано с немедленной активацией клеточных лигаз и удалением из внутреннего пространства клетки фрагментов ДНК со свободными двуцепочечными концами путем замыкания в кольцо (см. Лихачева и др., 2008). Эффективность синергичного действия ЦФ и ДНК в этом плане может объясняться тем, что ЦФ полностью меня-

ет молекулярную «физиологию» клетки и фрагменты дцДНК, интернализированные в СИРК, не подпадают под действие механизмов репарации двуцепочечных концов. Такие фрагменты в данных условиях или индуцируют программируемую гибель СИРК, или непосредственно в ядре interfering репаративный процесс в фазах NER и ГР.

Как было сказано выше, выбранные временные режимы инъекции ДНК привязаны к фазам репаративного процесса NER и ГР (Dolgova et al., 2014) (рис. 2, а, б). Если считать, что фрагменты дцДНК достигают внутриядерного пространства (как это показано в работе Dolgova et al., 2014, Fig. 1, b), то действие препаратов дцДНК может быть объяснено следующими соображениями. В литературе подробно, шаг за шагом, описано формирование и разрешение интермедиатов репарации МЦС (Räschle et al., 2008; Долгова и др., 2010; Muniandy et al., 2010; Deans, West, 2011). Первоначально идет формирование двуцепочечных разрывов, затем фаза NER. Далее происходит процессинг оставшегося двуцепочечного конца, и на последнем этапе осуществляется акт ГР (рис. 2, а, б). Для асцитных раковых клеток Кребс-2 эти фазы репарации разбиты на временные отрезки следующим образом (Dolgova et al., 2014). До 12 ч идет накопление двуцепочечных разрывов. Репарация двуцепочечных разрывов (фаза ГР) начинается через 24 ч и заканчивается через 30 ч после инъекции ЦФ. Между 12 и 24 ч происходят два события, а именно: осуществляется NER и формируется одноцепочечный участок двуцепочечного конца. Было обнаружено, что если вводится нативный препарат дцДНК человека последовательно в промежуток времени 1–12 (рис. 2, в1, «ЦФ+hDNA(1–12)») или единично в 18 ч (рис. 2, в2, «ЦФ+hDNA(18)»), то наблюдается значительная редукция туморогенного потенциала прививаемого трансплантата, что выражается в непрививаемости опухоли. Этот факт означает, что нативные фрагменты дцДНК человека interfering первые из перечисленных этапов репаративного процесса (до 18 ч), что негативно сказывается на выживании клеток. Если вводить нативную дцДНК в промежуток времени 18–30 ч после инъекции ЦФ, то фрагменты дцДНК попадают на завершающие фазы репаративного процесса. Возникшее взаимодействие способствует восстановлению целостности хроматина, что проявляется в предохранении СИРК от действия ЦФ и быстром развитии солидного трансплантата (Dolgova et al., 2014) (рис. 2, в3, «ЦФ+hDNA(18–30)»). Было обнаружено аналогичное действие на стволовые клетки крови (Likhacheva et al., 2007). И, таким образом, в зависимости от фазы репаративного процесса, нативные фрагменты дцДНК, интернализированные в СИРК, могут как элиминировать эти клетки или изменять их раковый статус и тем самым разрушать прививочный потенциал привитого графта, так и сохранять жизнеспособность СИРК и стимулировать развитие привитого трансплантата.

Если рассматривать максимально чувствительную, искроверканную кросс-линкированную дцДНК лосося, то процесс interfering выглядит иначе. Препарат такой ДНК практически не работает на стадии формирования двуцепочечных разрывов (NER) (1–18 ч) и в значительной степени interfering процесс репарации в фазе

процессинга двуцепочечных концов – ГР (рис. 2, в4, «ЦФ+ssDNAmix(18–30)»; рис. 2, г, левая мышь). При инъекциях смеси кросс-линкированной дцДНК лосося с нативной ДНК лосося (3/5) в промежутки времени 18–30 ч после инъекции ЦФ наблюдаются факты разрушения опухолевых свойств перевитого трансплантата даже в случае прививки 200 млн клеток (рис. 2, в5, «ЦФ+асцит (18 ч после ЦФ)+ssDNAmix (18–30)», полное описание эксперимента см. в статье Поттер и др., 2016).

Таким образом, показано, что проведенные обработки в определенном числе случаев приводят к полной потере трансплантатом опухолевого начала, что, как следует из результатов, представленных на рис. 1, по-видимому, связано с эрадикацией СИРК или изменением их ракового статуса. Это означает, что проводимое воздействие оказывается именно на СИРК, и именно отсутствие этих клеток или изменение их опухолевых свойств делает несостоятельным прививку экспериментального графта.

Из полученных результатов также следует, что 18 ч после введения ЦФ является переломной точкой репаративного процесса, разделяющей его на два отрезка. На первом отрезке репаративного процесса (NER, процессинг двуцепочечных концов) обработка препаратом нативной дцДНК убивает причинную раковую клетку или меняет ее раковый статус. На втором отрезке репаративного процесса (ГР) этот же препарат сохраняет жизнеспособность СИРК и стимулирует рост опухоли. При этом использование чужеродной модифицированной дцДНК на втором отрезке репаративного процесса приводит к частичной или полной элиминации СИРК или изменению ими злокачественного статуса и потере графтом опухоленности. Фаза формирования двуцепочечных разрывов составляет 12 ч (рис. 2, а). Сразу после формирования двуцепочечных разрывов следует NER. Фаза восстановления целостности хроматина начинается в 24 ч. Следовательно, 18 ч – это промежуточная точка фазы NER. Вероятно, воздействие на СИРК в случае нативной ДНК человека происходит при интерференции процесса формирования одноцепочечного участка в фазе NER. В фазе ГР фрагменты экстраклеточной дцДНК могут выступать в качестве внешней матрицы, позволяющей корректно завершить восстановление репликативной вилки.

Полученные данные предполагают, что СИРК можно полностью элиминировать из асцитной формы опухоли Krebs-2.

Действие дцДНК как монопрепарата на асцитные клетки Krebs-2

В работе (Alyamkina et al., 2015) продемонстрировано, что препарат дцДНК как независимый терапевтический агент индуцирует масштабный апоптоз асцитных клеток. При этом мода такой индукции отличается от воздействия одного ЦФ (Alyamkina et al., 2015, Fig. 1, C, Fig. 3, A). Многократно показано, что инъекции препарата дцДНК в монорежиме никак не влияют на перевивочный потенциал асцитных клеток (Dolgova et al., 2014).

Мы установили, что при добавлении к асцитным клеткам TAMRA-меченого ДНК-зонда все клетки, способные к захвату дцДНК, одновременно начинают интернализировать меченый зонд независимо от его количества в окру-

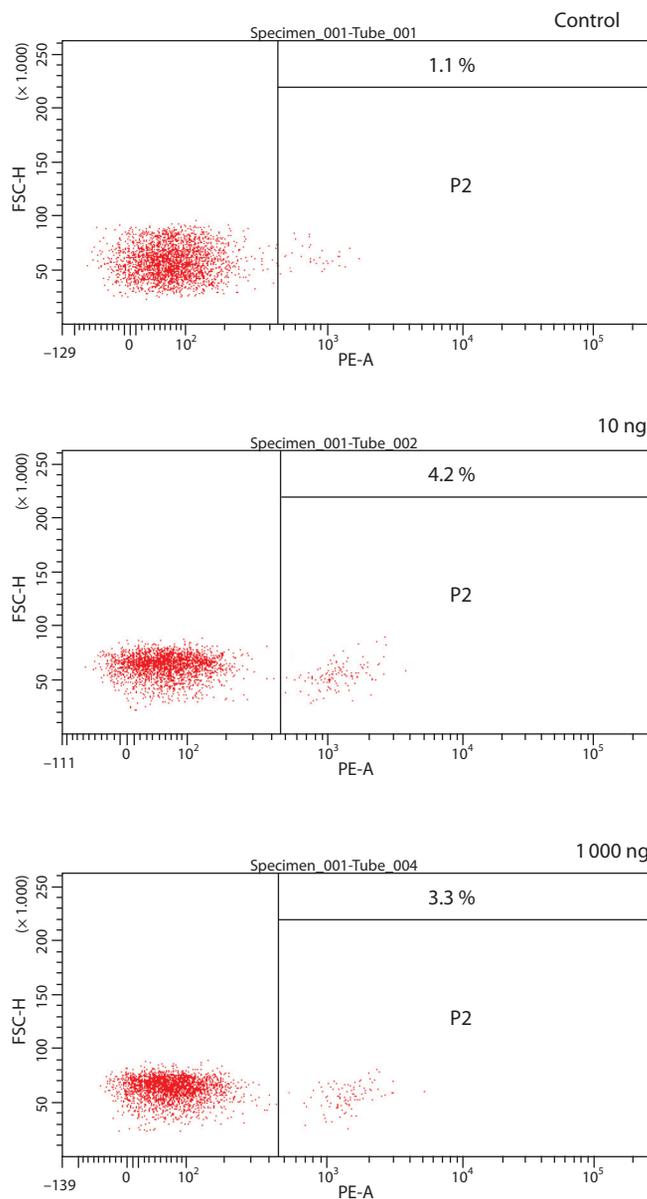


Fig. 3. Flow cytometry analysis of Krebs-2 ascites cells incubated with different amounts of TAMRA-labeled DNA for 1 hour.

Control: no TAMRA-DNA added; 10 ng and 1000 ng, Krebs-2 ascites cells incubated with 10 and 1000 ng TAMRA-labeled DNA, respectively; P2 is the population of TAMRA-positive cells. Percentages of corresponding cells are indicated for each sample.

жающей среде (рис. 3). Так, доля клеток асцита Krebs-2, включивших маркерную ДНК, при добавлении 10 нг меченого материала составила 4,2 % (рис. 3, «10 нг»), а при добавлении 1 000 нг – 3,3 % (рис. 3, «1 000 нг»), что свидетельствует о постоянной доле клеток, способных к захвату ДНК, независимо от количества. Также были проведены эксперименты в режиме реального времени по определению эффективности интернализации TAMRA-меченой ДНК на глиомах человека (Dolgova et al., 2014), при этом было показано, что интенсивность насыщения

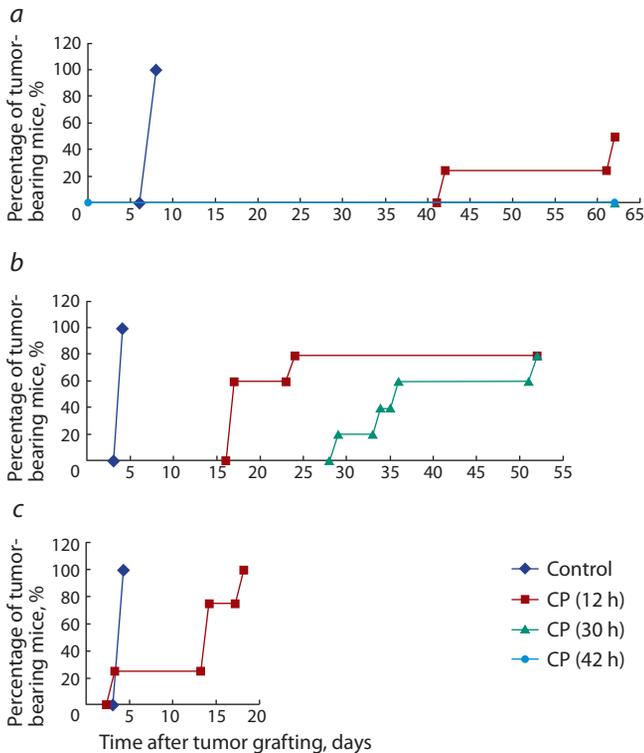


Fig. 4. Analysis of the ability of CP (administered as a monotherapy) to compromise the engraftment potential of Krebs-2 ascites.

(a) Formation of solid grafts upon engraftment of Krebs-2 ascites cells from an ascites-bearing mouse 12, 30 and 42 hrs after CP injection (100 mg/kg); (b) Detection of solid grafts upon engraftment of Krebs-2 ascites cells collected from an ascites-bearing mouse 12 and 30 hrs after CP-injection (100 mg/kg); (c) Percentage of mice with solid grafts upon engraftment of 1.500.000 Krebs-2 ascites cells taken from an ascites-bearing mouse 12 hrs after CP injection (100 mg/kg). The plot is reproduced from Fig. 1, c1 for reference.

индивидуальных клеток нейросфер увеличивается в течение времени инкубации (0–60 мин) без увеличения первоначального числа клеток.

Таким образом, от количества ДНК-зонда зависит только общая масса ДНК, попавшей в клетку: если в среде мало ДНК, в клетках ее будет мало, но одинаково мало во всех. Также если ДНК в среде будет, например, в количестве, достигающем порога насыщения, то все СИРК будут одинаково заполнены экстраклеточной дцДНК.

Действие циклофосфана как монопрепарата на перевивочный потенциал асцитных клеток Кребс-2 и на развитие асцитной формы опухоли

По ходу тестирования многочисленных режимов действия препаратов было выявлено, что цитостатик ЦФ обладает значимым циторедуцирующим эффектом при обработке перевитого трансплантата Кребс-2 (рис. 4). Прослеживалась следующая закономерность. При изъятии и перевивке асцитных клеток в количестве 300 тыс. через 12 ч после введения ЦФ графт частично прививался (рис. 4, а, «ЦФ (12 ч)»). При изъятии и перевивке такого же количества асцитных клеток, взятых через 30 или 42 ч после введения ЦФ, рост трансплантата не наблюдался (рис. 4, а,

«ЦФ (30 ч)», «ЦФ (42 ч)» соответственно). При изъятии и перевивке асцитных клеток в количестве 500 тыс. через 12 и 30 ч после введения ЦФ графт частично прививался, причем наблюдалась явная разница в количестве привившихся клеток (рис. 4, б, «ЦФ (12 ч)», «ЦФ (30 ч)» соответственно). У образца «ЦФ (12 ч)» в 80 % случаев наблюдалась прививка опухоли, тогда как в образце «ЦФ (30 ч)» трансплантат прививался у 60 % животных. При изъятии и перевивке асцитных клеток в количестве 1,5 млн через 12 ч после введения ЦФ графт приживался на 100 % (рис. 4, в, «ЦФ (12 ч)»). Полученные данные свидетельствовали, что после обработки в организме донора и перевивки реципиенту в асцитных клетках происходят процессы, не позволяющие им развиваться в полноценный графт. При этом для развития трансплантата имеет значение количество перевиваемых клеток. Увеличение их числа примерно в два раза при одном и том же времени терапевтической экспозиции приводит к прививке трансплантата, не прививающегося при перевивке меньшего количества клеток (рис. 4, в, «ЦФ (30 ч)»). Такой результат предполагает, что эффективность прививки графта зависит от количества жизнеспособных СИРК, сохранившихся в образце перевиваемых клеток асцита Кребс-2.

Анализ продолжительности репаративного цикла раковых клеток Кребс-2 был выполнен в работе (Dolgova et al., 2014). Установлено, что к 36 ч от момента введения ЦФ репаративный цикл полностью завершается. Снижение перевивочного потенциала асцитных клеток по мере удаления от времени введения ЦФ (в пределах 42 ч) может быть связано с гетерогенностью стволовых раковых клеток в распределении по клеточному циклу. Возможно, что на ранних временных отрезках не все СИРК получают летальное повреждение, а изъятие таких «недобитых» клеток из организма предотвращает действие фактора киллинга и позволяет этим клеткам восстановить свой туморогенный потенциал. Ближе к концу репаративного цикла подавляющее большинство СИРК такое повреждение получает. Возможно, что в элиминации СИРК участвует не только метаболит ЦФ фосфорамид мустард, индуцирующий МЦС, но и другие метаболиты ЦФ, также обладающие выраженной цитотоксичностью.

Проведенные исследования предполагали существование значимого терапевтического действия ЦФ на развитие асцита Кребс-2. В этой связи были выполнены эксперименты по оценке действия инъекций ЦФ в форме монопрепарата на развитый асцитный трансплантат (рис. 5). ЦФ вводился одно-, дву-, трех- или четырехкратно, что указано в конкретных экспериментах. Одноразовая доза ЦФ составляла 50 или 100 мг/кг веса животного (суммарная доза для всех мышей составляла 300 мг/кг), что также отмечено в каждом конкретном эксперименте. Выбор промежутков времени инъекции ЦФ был связан с экспериментально обнаруженным временем появления и репарации двуцепочечных разрывов, являющихся интермедиатами репарации МЦС, индуцированных ЦФ, и был привязан к нему (Dolgova et al., 2014).

В приведенных на рисунках сравнениях взяты либо наиболее эффективные, либо демонстрирующие определенную закономерность режимы с использованием ЦФ. Идеология использования того или иного режима

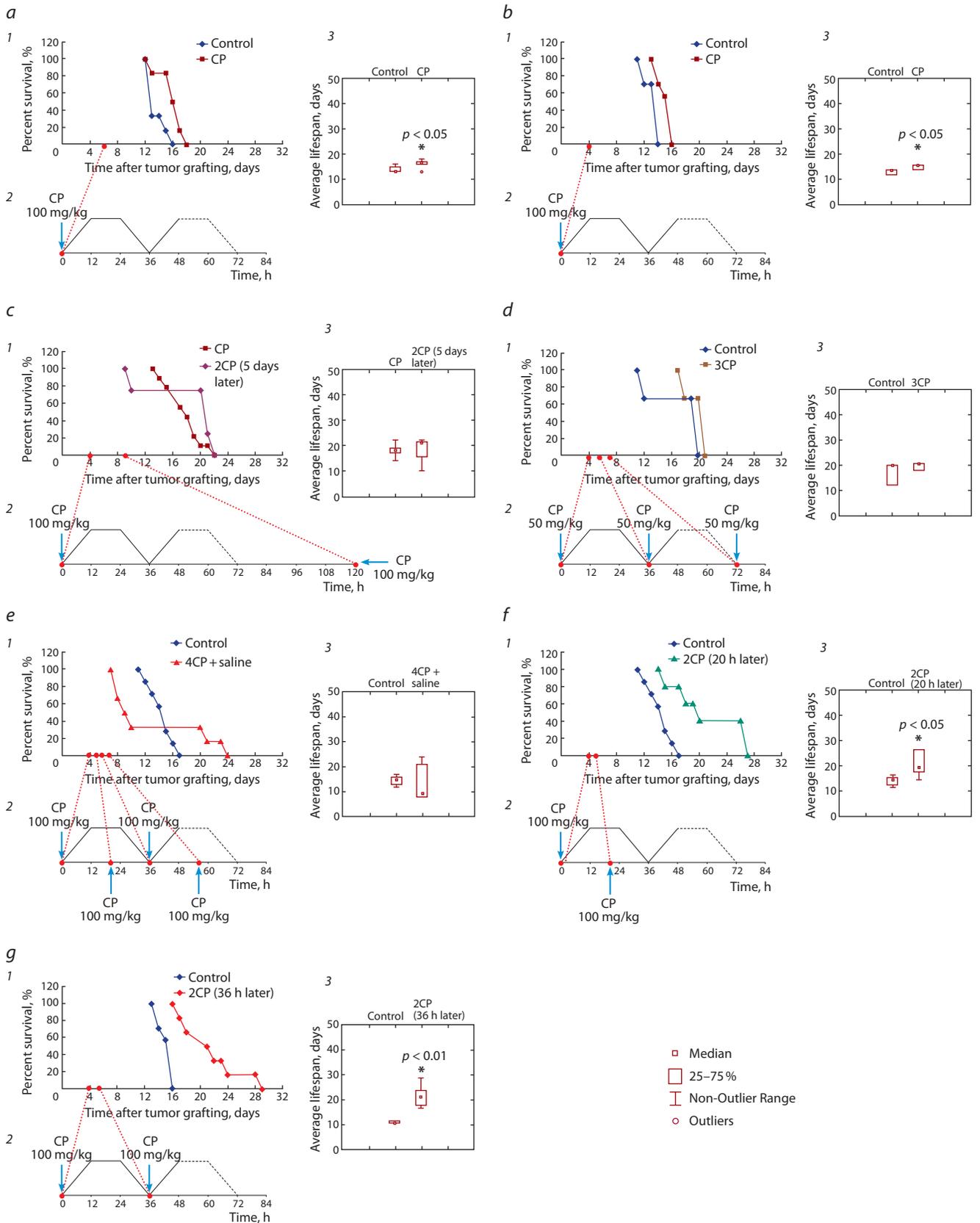


Fig. 5. Analysis of the therapeutic action of the cytostatic drug cyclophosphamide on the well-developed ascites form of the mouse Krebs-2 tumor. Different injection regimens were tested.

1, Kaplan-Meier survival curve of ascites-engrafted mice; 2, drug administration schedule; 3, average survival time after the treatments (Mann-Whitney U test). a, CBA mice with 6d-old ascites tumors; b, C57B1 mice with 4d-old ascites tumors; c, d, e, f, g, different CP treatment schedules targeting 4-day old Krebs-2 ascites tumors.

обсуждается по ходу описания экспериментальной части работы.

В начальных экспериментах на линиях C57Bl и CBA (рис. 5, а1, «ЦФ», б2, «ЦФ») было показано, что инъекции ЦФ в монорежиме увеличивают продолжительность жизни последнего животного в группе (max) на двое суток, или на ~13 %. Медианы продолжительности жизни различаются незначительно и не отличаются от контролей. Эти два показателя использовались в дальнейшем для характеристики эффективности режимов.

Как следует из результатов, полученных в работе (Dolgorova et al., 2014), молекулы кросс-линкированной ДНК не принимают компенсирующего участия в репаративном процессе в фазе ГР. Можно было полагать, что торможение роста опухоли при инъекциях модифицированной ДНК лосося или ДНК человека в режиме 18–30 ч связано с интерференцией молекулярной машины одной репаративной системы молекулярной машиной другой. Это означает, что процесс ГР как фазы репарации МЦС интерферирует или процесс NHEJ (Non-Homologous End Joining), индуцированный концами кросс-линкированных фрагментов экстраклеточной дцДНК, не способных к денатурации, или процесс NER, индуцированный новыми кросс-линк сайтами тех же фрагментов, доставленных в ядро СИРК. Это наблюдение подразумевало возможность аналогичного действия двух независимых инъекций ЦФ, проведенных в различные фазы репарации межцепочечных сшивков. Предполагалось, что при второй инъекции ЦФ в фазу ГР будут индуцироваться новые кросс-линки, которые активируют механизм формирования двуцепочечных концов и NER. Молекулярные машины обеих систем вступают в конфликт, и полученный результат будет подобен действию кросс-линкированной ДНК.

Для проверки этой гипотезы авторы провели серию экспериментов с использованием обеих линий животных и показали, что инъекции двух ЦФ (вторая – на 5-е сутки) действует так же, как и одна инъекция ЦФ (конечная доза одинаковая). Последние животные погибают одновременно как в группе ЦФ, так и в группе 2ЦФ (вторая – на 5-е сутки) (рис. 5, в). Повторная инъекция ЦФ, сделанная в 20 (фаза ГР) или 36 ч (обнаружение кросс-линк популяцией раковых клеток, находящихся в момент первой инъекции ЦФ в поздней G2- или M-фазе клеточного цикла), увеличивает продолжительность жизни последнего животного (max) на 10–17 д, или на 58–141 % по отношению к таковой последнего животного в контроле (рис. 5, е, «2ЦФ (через 20 ч)»; ж, «2ЦФ (через 36 ч)» соответственно).

На клетках костного мозга (Dolgorova et al., 2012, 2013) и асцитных раковых клетках Кребс-2 (Dolgorova et al., 2014) показано, что появление и исчезновение двуцепочечных разрывов для одной и той же популяции обрабатываемых клеток имеют два пика. Этот факт связывался с гетерогенностью исходной популяции, в которой первая волна двуцепочечных разрывов формируется в клетках, находящихся в момент обработки в G1- и S-фазах клеточного цикла. Вторая волна, составляющая 15–20 % от первой, образуется в клетках, находящихся в момент обработки в поздней G2- или M-фазе клеточного цикла. Этот факт свидетельствовал о том, что для эффекта «смертельной интерференции» репарации МЦС, охватывающей всю

популяцию СИРК, нужно проводить терапевтическую обработку препаратом ДНК как минимум дважды. При повторной терапии в промежутки времени 36–48 ч будет оказано воздействие на клетки, содержащие двуцепочечные разрывы второй волны. Следует помнить, что часть СИРК могут находиться в G0-фазе и что они в этом случае будут неуязвимы до выхода из покоящегося состояния и прохода по пролиферативному циклу.

Поскольку действие повторной инъекции ЦФ в 20 ч попадает на идущую репаративную систему ГР, а действие второго ЦФ в 36 ч – на вторую малочисленную популяцию СИРК, которая при первой инъекции ЦФ была в поздней G2- или M-фазе, то эффективно будет применить режимы введения ЦФ, охватывающие оба терапевтических воздействия. Одновременно с этим в терапию необходимо ввести препараты дцДНК.

Полученные данные предполагают, что в схемах лечения асцита Кребс-2 нужно использовать несколько последовательных инъекций ЦФ, перекрывающих чувствительные к обработке ЦФ и ЦФ в синергизме с ДНК фазы клеточного цикла. Следует провести экспериментальную оценку эффективности комбинаций инъекций ЦФ в сочетании с инъекциями ДНК во временные точки 0, 18, 36, 54, 72, 90 ч, перекрывающих в различных по времени сочетаниях для ЦФ фазу наложения двух репаративных систем, NER и ГР, и захватывающих вторую волну двуцепочечных разрывов (клеток в G2- или M-фазе) после предыдущего введения ЦФ в случае инъекций препарата ДНК.

Как показано в работе (Alyamkina et al., 2015), инъекции дцДНК в монорежиме и в синергизме с ЦФ смертельно токсичны для экспериментальных животных с опухолью более 3 см³. Также такие обработки приводят к скоротечной синхронной гибели мышей-асцитиносов с асцитом старше 7 сут (Alyamkina et al., 2015). Тем не менее длительная ремиссия в развитии привитого графта, обнаруженная в работе (Alyamkina et al., 2015), предполагала возможность излечения мышей от асцитной формы рака Кребс-2. Для поиска и отработки эффективного режима полной эрадикации асцита у мышей с перевитым асцитом Кребс-2 проведена серия последовательных экспериментов, описанная в следующих разделах цикла. Лейтмотивом всей совокупности экспериментальных подходов является найденный и охарактеризованный в работе (Dolgorova et al., 2014) феномен интернализации фрагментов дцДНК в СИРК Кребс-2 и интерференции этими фрагментами процесса репарации МЦС.

Результаты, полученные в настоящей работе цикла исследований, создают экспериментальную платформу для выбора режимов обработки мышей-асцитиносов и их применения в терапии асцитного рака Кребс-2. Можно назвать следующие отправные точки при подборе режимов.

1. Для предотвращения гибели экспериментальных животных от системной воспалительной реакции и следующей за ней полиорганной недостаточности необходимо во всех экспериментах использовать мышей с развитым асцитом в возрасте 4–5 сут от прививки 2×10^6 асцитных клеток.
2. Для успешного лечения необходимо использовать несколько инъекций ЦФ, осуществляя следующую по порядку инъекцию, когда одна активированная

репаративная молекулярная машина (NER) будет накладываться на другую (ГР), а в сочетании с препаратом ДНК будет перекрываться популяция раковых клеток, находящихся в момент первой инъекции ЦФ в G2- или M-фазе клеточного цикла.

3. В режим цитостатической обработки следует добавить инъекции ДНК в промежутки времени 1–12 и (или) 18–30 ч после инъекции ЦФ. Необходимо охарактеризовать режим одновременного воздействия препаратов дцДНК в фазу NER и фазу ГР. При этом в фазе NER должна быть использована нативная ДНК человека, а в фазу ГР – максимально исковерканная, генеалогически отдаленная ДНК лосося.

Указанные детали объединяют все наиболее эффективные обработки, значительно редуцирующие развитие опухоли мыши Krebs-2.

Acknowledgments

This work was done as part of State Contract 0324-2015-0003.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Orishchenko K.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Zagrebelskiy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combined therapy with cyclophosphamide and DNA preparation inhibits the tumor growth in mice. *Genet. Vaccines Ther.* 2009;7(1)(12). DOI 10.1186/1479-0556-7-12
- Alyamkina E.A., Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Protamine association with exogenous DNA's versus its ability to inhibit experimental tumors. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology.* 2009;55(6):765-768.
- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Efremov Y.R., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Sidorov S.V., Ponomarenko D.M., Zagrebelskiy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. A strategy of tumor treatment in mice with doxorubicin-cyclophosphamide combination based on dendritic cell activation by human double-stranded DNA preparation. *Genet. Vaccines Ther.* 2010;8(1)(7). DOI 10.1186/1479-0556-8-7
- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015;15(32). DOI 10.1186/s12935-015-0180-6
- Bespalov V.G., Zhabin A.A., Stukov A.N., Belyaeva O.A., Murazov Y.G., Semenov A.L., Konkov S.A., Krylova I.M. Synergistic antitumor effect of dioxodate and cisplatin on the model of ovarian ascites tumor. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology.* 2013;1:42-46.
- Blohin N.N., Perevodchikova N.I. *Khimioterapiya opukholevykh zabolovaniy [Chemotherapy of neoplastic diseases].* Moscow, Meditsina, 1984.
- Brenner D.E. Intraperitoneal chemotherapy: a review. *J. Clin. Oncol.* 1986;4(7):1135-1147.
- Deans A.J., West S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2011;11(7):467-480. DOI 10.1038/nrc3088
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene.* 2013;528(2):74-83. DOI 10.1016/j.gene.2013.06.058
- Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Orishchenko K.E., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Repair of interstrand crosslinks in a DNA molecule. *Informatsionnyy vestnik VOGIS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2010;14(2):332-356.
- Dolgova E.V., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Alyamkina E.A., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Prokopenko A.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Zagrebelskiy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. «Delayed death» phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA. *Gene.* 2012; 495(2):134-145. DOI 10.1016/j.gene.2011.12.032
- Light R.W. *Pleural disease.* Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1980. (Russ. ed.: *Layt R.U. Bolezni plevry.* Moscow, Meditsina, 1986:106-119).
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Rogachev V.A., Prokhorovich M.A., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose γ -radiation. *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007; 11:305-314.
- Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gelfgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionnyy vestnik VOGIS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists.* 2008;12(3):426-473.
- Muniandy P.A., Liu J., Majumdar A., Liu S.T., Seidman M.M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010;45(1):23-49. DOI 10.3109/10409230903501819
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117
- Räschle M., Knipscheer P., Enouï M., Angelov T., Sun J., Griffith J.D., Ellenberger T.E., Schärer O.D., Walter J.C. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell.* 2008; 134(6): 969-980. DOI 10.1016/j.cell.2008.08.030
- Stenina M.B. Controversial issues in the treatment of ovarian cancer. *Trudnyy patsient: spetsvypusk "Onkologiya" = An inveterate patient: Oncology.* 2006;4(11):9-14.

Характеристика режимов терапевтического воздействия циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК на опухоль Кребс-2, растущую в асцитной форме, приводящих к эрадикации первичного асцита

Е.А. Поттер¹, Е.В. Долгова¹, А.М. Минкевич¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова^{1,2}, Я.Р. Ефремов^{1,2}, С.И. Байбородин^{1,2}, В.А. Рогачев¹, А.С. Проскурина¹, А.В. Козел^{1,2}, О.С. Таранов³, В.В. Омигов³, Е.И. Верещагин⁴, Д.Б. Петров⁵, А.А. Останин⁶, Е.Р. Черных⁶, Н.А. Колчанов¹, С.С. Богачев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

⁵ Общество с ограниченной ответственностью торговый дом «Терморобот», Новосибирск, Россия

⁶ Институт клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

В настоящей статье цикла были протестированы многочисленные режимы воздействия циклофосфана (ЦФ) и препаратов двуцепочечной ДНК (дцДНК) на асцитную форму опухоли Кребс-2 *in situ* на мышах линий C57Bl и CBA. Показано, что синергическое действие цитостатика ЦФ и препаратов кросс-линкованной дцДНК человека и лосося имеет выраженный токсический эффект на животных с развитым асцитом, о чем свидетельствует гистологический анализ органов и тканей экспериментальных животных. В то же время использование смеси нативного и кросс-линкованного препаратов дцДНК человека и лосося приводит к достоверному увеличению средней продолжительности жизни животных. Установлено, что повторные инъекции ЦФ, дополненные обработкой препаратами дцДНК, имеют наиболее выраженный противораковый эффект. Повторное введение препаратов воздействует на клетки, находившиеся во время предыдущих обработок в нечувствительной фазе клеточного цикла G2-M. Трех- или четырехкратное повторение терапевтических процедур приводит к максимальной элиминации стволовых иницирующих раковых клеток (СИРК) из опухолевой массы. Разработана схема инъекций препаратов, приводящая к одновременной полной резорбции первичного асцита у всей экспериментальной группы животных, достигающей семи-девяти-суточной фазы ремиссии. Однако такой режим не позволяет избежать развития вторичной опухоли в асцитной или солидной форме, что, по-видимому, связано с миграцией клеток асцита в близлежащие ткани или сохранением жизнеспособности СИРК. Дополнительно проведенные масштабные патоморфологические исследования свидетельствовали о том, что, помимо вторичных опухолей, гибель животных определяет развивающаяся системная воспалительная реакция (СВР) и ее терминальная стадия – полиорганная недостаточность (ПОН). Сформулированы базовые положения концепции терапии асцитного рака Кребс-2, позволяющие полностью элиминировать первичный асцит.

Ключевые слова: двуцепочечная ДНК; циклофосфан; асцит Кребс-2; стволовые иницирующие раковые клетки; ремиссия; NER; гомологичная рекомбинация; системная воспалительная реакция; полиорганная недостаточность.

Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice

E.A. Potter¹, E.V. Dolgova¹, A.M. Minkevich¹, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova^{1,2}, Ya.R. Efremov^{1,2}, S.I. Baiborodin^{1,2}, V.A. Rogachev¹, A.S. Proskurina¹, A.V. Kozel^{1,2}, O.S. Taranov³, V.V. Omigov³, E.I. Vereschagin⁴, D.B. Petrov⁵, A.A. Ostanin⁶, E.R. Chernykh⁶, N.A. Kolchanov¹, S.S. Bogachev¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ The State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical Academy, Novosibirsk, Russia

⁵ LLC «Termorobot» Novosibirsk, Russia

⁶ Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

In the present paper, we report a series of experiments where multiple regimens of CP and dsDNA injections were tested for targeting the ascites form of murine Krebs-2 cancer *in situ*. We show that combining CP with cross-linked human and salmon dsDNA results in a synergistic toxicity for ascites-bearing mice, an observation supported by a histopathological analysis of organs and tissues of experimental animals. By contrast, using a composite mixture of native and cross-linked human and salmon DNA after CP injections leads to a significant increase in the average lifespan of the treated mice. Furthermore, we demonstrate that repeated rounds of CP + dsDNA injections result in a dramatic anticancer effect. The timing of injections is chosen so that they target the cells that are insensitive to the previous treatments as they were in the G2/M phase. 3-4 rounds of injections are needed to eliminate the subpopulation of tumor-

initiating cancer stem cells. Our experiments identified the regimen when complete resorption of the primary Krebs-2 ascites occurs in all of the treated animals, followed by a remarkable remission period lasting 7–9 days. Yet, this regimen does not prevent secondary site metastases (either solid or ascites form), which is likely caused by the migration of ascites cells into adjacent tissues or by incomplete eradication of cancer stem cells. To address these and other questions, we expanded the study and performed a histopathological analysis, which indicated that secondary metastases are not the only cause of death. In fact, many animals displayed unfolding systemic inflammatory reaction which was culminated by multiple organ failure. Thus, we have developed a concept for treating the ascites form of Krebs-2 cancer, which allows the primary ascites to be eliminated.

Key words: double-stranded DNA; cyclophosphamide (CP); Krebs-2 ascites; tumor-initiating stem cells; remission; NER; homologous recombination; systemic inflammatory reaction; multiple organ failure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поттер Е.А., Долгова Е.В., Минкевич А.М., Николин В.П., Попова Н.А., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Рогачев В.А., Проскурина А.С., Козел А.В., Таранов О.С., Омигов В.В., Верещагин Е.И., Петров Д.Б., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Характеристика режимов терапевтического воздействия циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК на опухоль Кребс-2, растущую в асцитной форме, приводящих к эрадикации первичного асцита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Nikolin V.P., Popova N.A., Efremov Ya.R., Baiborodin S.I., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Kozel A.V., Taranov O.S., Omigov V.V., Vereschagin E.I., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Analysis of different therapeutic schemes combining cyclophosphamide and double-stranded DNA preparations for eradication of Krebs-2 primary ascites in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):108-124. DOI 10.18699/VJ15.117

Введение в проблематику лечения малигнизированного асцитного рака было сделано в первой статье настоящего цикла исследований (Поттер и др., 2016). Основное его положение состоит в том, что, несмотря на широко применяемые методы циторедуцирующей и гормональной терапии (Блохин, Переводчикова, 1984; Лайт, 1986; Brenner, 1986; Стенина, 2006; Беспалов и др., 2013), в современной медицинской практике отсутствует метод полного излечения больных от асцитной формы рака. В цикле представленных работ главной целью исследований является поиск режима излечения асцитного рака на модели опухоли Кребс-2 у мышей.

Проведенные эксперименты предыдущего раздела цикла дали основание считать, что синергичное действие циклофосфана (ЦФ) и двуцепочечной ДНК (дцДНК) оказывает разрушительное действие на стволовые иницирующие раковые клетки (СИРК), что приводит к неперевиваемости клеток обработанного асцита в виде солидных трансплантатов. Можно было полагать, что режимы введения ЦФ+ДНК (1–12, 18–30 ч после инъекции ЦФ) и новая композиция двух препаратов, состоящая из смеси нативной и кросс-линкированной дцДНК (ICL-DNA), позволят полностью эрадикаровать привитый и развитый асцитный трансплантат и составят основу новой терапевтической стратегии лечения рака. Длительная ремиссия в развитии привитого асцитного графта, обнаруженная в работе (Alyamkina et al., 2015), подразумевала возможность излечения мышей от асцитной формы рака Кребс-2.

В настоящей части цикла асцит обрабатывали непосредственно в организме мыши. Протестировали различные схемы совместного введения одной или нескольких инъекций цитостатика ЦФ и разных сочетаний препаратов дцДНК. Некоторые схемы дополнили введением антибиотика гентамицина для купирования бактериального заражения животных, а также активацией адаптивного иммунитета (АИ) и трансплантацией клеток костного мозга (ККМ). В экспериментах оценивали состояние животных, продолжительность их жизни, степень развития асцита. Погибших животных подвергали патоморфологическому анализу с целью выяснения причин гибели.

Материалы и методы

Подробная информация о методах исследования, экспериментальных животных, опухолевой модели, получении препарата ДНК человека и лосося, подготовке кросс-линкированного нитроген-мустардом препарата ДНК, а также анализ перевивочного потенциала обработанных *ex vivo* препаратом ДНК клеток асцита Кребс-2, находящихся под воздействием ЦФ, и статистическая обработка данных представлены в разделе «Материалы и методы» в предыдущей статье настоящего цикла исследований (Поттер и др., 2016).

Введение препаратов циклофосфана, экзогенной ДНК и антибиотика гентамицина

Для того чтобы избежать гибели мышей от токсического действия разрушающихся раковых клеток, здесь и везде

далее использовали четырех- или пятидневный асцитный графт, полученный в результате прививки 2 млн раковых клеток (ко времени обработки препаратами количество асцитных клеток достигало 250–300 млн и объем асцитной жидкости составлял в среднем 1,25 мл).

Цитостатик ЦФ вводили мышам внутривентриально (в/б) в дозе 50 или 100 мг/кг веса животного (суммарная доза для всех мышей составляла 300, в некоторых случаях 400 мг/кг) одно-, дву-, трех- или четырехкратно, что отмечено в каждом конкретном эксперименте.

Препараты дцДНК: ssDNA (нативная ДНК лосося), hDNA (нативная ДНК человека), ICL-ssDNA (кросс-линкированная ДНК лосося), ICL-hDNA (кросс-линкированная ДНК человека), ssDNAmix (смесь: нативная ДНК лосося/кросс-линкированная ДНК лосося 3/1 или 5/3), hDNAmix (смесь: нативная ДНК человека/кросс-линкированная ДНК человека 3/1 или 5/3) вводили в/б в дозе 0,5–1 мг на инъекцию каждые 1, 2 или 3 ч (суммарно по 6 мг ДНК на мышь за 12 ч). Временные интервалы введения препаратов либо описаны непосредственно в тексте, либо изображены схематически на соответствующих рисунках. Режимы введения ДНК: 1–12, 18–30, 1–20, 20–36 ч после инъекции ЦФ. Выбор промежутков времени инъекций препарата дцДНК после введения ЦФ был связан с экспериментально обнаруженным временем появления и репарации двуцепочечных разрывов, являющихся интермедиатами репарации межцепочечных сшивков, индуцированных ЦФ, и был привязан к нему (Dolgova et al., 2014).

Антибиотик гентамицин вводили животным в/б по 0,2 мг/мышь через каждые 1–2 сут в течение месяца относительно начала эксперимента.

Активация адаптивного иммунитета

Для активации у экспериментальных животных АИ вводили препарат нативной ДНК человека («Панаген») через 1, 2 и 3 сут после последней инъекции ЦФ по 500 мкг/мышь (Alyamkina et al., 2010c).

Пересадка клеток костного мозга

Для получения ККМ использовали здоровых мышей-доноров использованных линии. Клетки костного мозга вымывали раствором PBS из больших берцовых костей, промывали средой RPMI-1640, подсчитывали в камере Горяева и вводили в хвостовую вену экспериментальным животным в количестве 200 тыс. клеток/мышь.

Патоморфологический анализ тканей и органов мышей

Кусочки органов фиксировали в 4 %-м параформальдегиде, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Волкова, Елецкий, 1971). Просмотр препаратов и микрофотосъемку проводили на световом микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия).

Оценка ремиссии асцитной опухоли Кребс-2

О ремиссии заболевания судили визуально: «уходом» асцита считали состояние мыши, когда внешний вид

живота соответствовал виду интактного животного и появлялись характерные рубцы, свидетельствующие о резком уменьшении объема жидкости, находящейся в брюшной полости.

Результаты

В начальных экспериментах на линиях C57Bl и CBA было показано, что инъекции ЦФ в монорежиме незначительно влияют на развитие асцитной опухоли Кребс-2 (Поттер и др., 2016). Результаты настоящего исследования организованы в виде нескольких серий экспериментов, отражающих определенную логическую линию. В сравнениях, приведенных на рисунках, представлены либо наиболее эффективные, либо демонстрирующие определенную закономерность режимы с использованием того или иного препарата. Идеология использования конкретного режима обсуждается по ходу описания экспериментальной части работы.

Контрольными значениями в экспериментах были выбраны: средняя продолжительность жизни (СПЖ), продолжительность жизни последнего животного в группе, ремиссия в развитии асцита и ее продолжительность в группе. Эти показатели использовались для характеристики эффективности режимов.

Характеристика токсического синергичного действия циклофосфана и препаратов кросс-линкированной ДНК лосося и человека на развитый асцит Кребс-2.

Первая серия экспериментов

Ранее было показано, что кросс-линкированная дцДНК лосося (ICL-ssDNA) в сочетании с ЦФ, так же как и дцДНК человека (hDNA), используемая в сочетании с цитостатиком, разрушает туморогенный потенциал обработанных асцитных клеток Кребс-2, перевиваемых в форме солидного трансплантата (Dolgova et al., 2014; Поттер и др., 2016). При этом время введения такой ДНК после инъекции ЦФ для проявления терапевтического эффекта отличалось от времени введения препарата hDNA.

Было сделано предположение, что препараты чистых ICL-ssDNA и (или) ICL-hDNA в синергизме с ЦФ могут обладать выраженным прямым терапевтическим действием на развитый асцит. Проведенные эксперименты свидетельствовали, что использование чистых ICL-ssDNA и ICL-hDNA в сочетании с ЦФ крайне токсично для экспериментальных мышей. Применение такой терапии приводит к гибели мышей, как предполагается, от развивающейся системной воспалительной реакции (СВР), переходящей в сепсис (Alyamkina et al., 2015). Было выполнено несколько серий экспериментов с почасовыми инъекциями препарата ICL-hDNA в синергизме с ЦФ. Мыши погибали в результате развития характерного симптомокомплекса. Был проведен патоморфологический анализ органов и тканей мышей из различных групп, взятых в агонистической фазе развития болезни и обработанных при различных режимах и различными препаратами дцДНК (рис. 1). Полученные результаты свидетельствовали о выраженном воспалительном процессе в организме экспериментальных мышей. Показателями

воздействия на организм животных являются, прежде всего, поражения печени и селезенки, а также воспалительные изменения в легких отдельных мышей. Наиболее выраженные изменения в печени в виде участков некробиоза отмечены в группах ЦФ+ICL-hDNA (1–12) и ЦФ+ICL-hDNA (18–30). Для всех животных, включая контрольную группу, характерны очаговые воспалительные изменения в легких. Эти проявления наиболее выражены в группах ЦФ+hDNA (1–12) и ЦФ+ICL-hDNA (1–12), в которых воспалительный процесс приобретает крупноочаговый характер и распространяется на плевру. Крайняя редукция лимфатических фолликулов селезенки, характерная для всех животных в эксперименте, вероятно, отражает функциональную незрелость данного органа. К такому выводу подталкивает отсутствие какой-либо морфологической вариабельности в течение эксперимента. Отсутствуют фолликулы с типичной структурой, нет тенденции к компенсаторной гиперплазии фолликулов. Кроме общих для всех животных патологических изменений селезенки, отмечен некроз пульпы в группе ЦФ+ICL-hDNA (1–12). По выраженности патологических проявлений в печени и селезенке выделяется группа ЦФ+ICL-hDNA (1–12), в которой эти проявления достигали степени некроза. В демонстрационном эксперименте видно, что экспериментальные мыши, обработанные ЦФ и ICL-ssDNA (18–30), погибли существенно раньше, чем мыши, обработанные одним ЦФ (рис. 2, а, кривая L2).

На этом и последующих рисунках на иллюстрациях инъекций (рис. 2, а3, б3, в3; рис. 3, а3, б3, в3, г3; рис. 4, а3, б3; рис. 6, 3) схематично изображена динамика накопления, репарации и исчезновения двуцепочечных разрывов, вызванных действием цитостатика ЦФ. Сплошными линиями изображены ранее полученные экспериментальные данные, пунктиром – предположительный путь развития репаративных событий на основании уже имеющихся данных (Поттер и др., 2016; Dolgova et al., 2014).

Патологические изменения характеризуется крайне негативным прогнозом для выживаемости экспериментальных мышей. В этой связи в последующих экспериментах использовалась смесь кросс-линкированной и нативной дцДНК, которая оказалась менее токсичной и в то же время демонстрировала высокий терапевтический эффект (см. следующий раздел).

Характеристика синергического действия циклофосфана и препаратов hDNAmix и ssDNAmix, приводящего к замедлению развития асцита Krebs-2. Вторая серия экспериментов

Эксперименты с использованием одной инъекции ЦФ с дальнейшей обработкой различными препаратами дцДНК, проведенные на обеих линиях мышей, свидетельствовали, что препараты hDNAmix и ssDNAmix в режиме введения 1–12 ч после инъекции ЦФ демонстрируют наиболее эффективные для этой серии экспериментов результаты (рис. 2, б, кривая L2; в, кривая L2). Обработки увеличивают продолжительность жизни последнего животного в группе на 4–8 сут, или на ~24–57 %. Медианы СПЖ достоверно на ~25–30 % отличаются от контролей.

Анализ воздействия нескольких инъекций цитостатика циклофосфана в сочетании с препаратами ДНК человека и лосося на развитый асцитный трансплантат Krebs-2. Третья серия экспериментов

Как следует из обсуждения действия ЦФ в форме монопрепарата и результатов синергичного действия ЦФ и ДНК, описанных в первой статье цикла (Поттер и др., 2016), сочетание введения нескольких инъекций ЦФ и ДНК является наиболее эффективным в лечении асцитной формы рака Krebs-2. В настоящем исследовании было показано, что при двукратной инъекции ЦФ с интервалом в 36 ч и дополнительной обработке препаратами hDNAmix (1–12) или ssDNAmix (18–30) после каждой инъекции ЦФ продолжительность жизни последнего животного в группе не увеличивается относительно двух инъекций ЦФ (рис. 3, а, кривая L2; б, кривая L2, данные для двух инъекций ЦФ см. в статье Поттер и др., 2016). Тем не менее медиана СПЖ в группах, получавших ДНК, достоверно выше, чем в группе животных, получавших только две инъекции ЦФ, и составляет для ЦФ 22 дня, для ЦФ+ДНК – 24–26 сут (10–18 %) (рис. 3, а1, кривая L2, а2, столбец L2; б1, кривая L2, б2, столбец L2). Для такой агрессивной опухоли, как асцитная форма Krebs-2, это существенный показатель. Полученный результат свидетельствовал о том, что указанные препараты дцДНК оказывают достоверное тормозящее действие на рост графта.

Как было сказано выше, использование нескольких инъекций ЦФ в сочетании с введением препаратов дцДНК может оказаться эффективной мерой эрадикации развитого асцита Krebs-2. В проведенных экспериментах установлено, что введение дополнительных инъекций ЦФ, последовательно каждый раз захватывающих G1-S-фазу оставшихся клеток, находящихся в момент предыдущих инъекций ЦФ в предыдущей G2-M-фазе, в значительной степени усиливает эффект торможения роста асцита у экспериментальных животных. Для данной серии экспериментов наиболее эффективными оказались режимы 4ЦФ+ssDNA (1–12) и 4ЦФ+hDNAmix (1–12), при которых ЦФ вводили в 0, 20, 36 и 56 ч, а препараты ДНК – в течение 12 ч ежедневно после первой и третьей инъекций ЦФ. Проведенная обработка увеличивает продолжительность жизни последнего животного в группе на ~165 % по сравнению с контролем и составляет 43–45 сут после начала эксперимента. Медиана СПЖ на ~40 % больше, чем в контрольной группе (рис. 3, в1, кривая L2, в2, столбец L2; г1, кривая L2, г2, столбец L2).

Общее заключение по трем сериям экспериментов раздела предполагает, что для дальнейшего поиска эффективного режима эрадикации первичного асцита Krebs-2 следует использовать три–четыре инъекции ЦФ в комбинации с нативной или со смесью нативной и кросс-линкированной ДНК человека в режиме ЦФ+hDNA (1–12) и (или) со смесью нативной и кросс-линкированной ДНК лосося в режиме ЦФ+ssDNAmix (18–30).

Проведенные эксперименты свидетельствовали о следующем. Наиболее эффективная терапия увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных более чем в два раза, но к полному излечению от первичного асцита не приводит. Все мыши погибают.

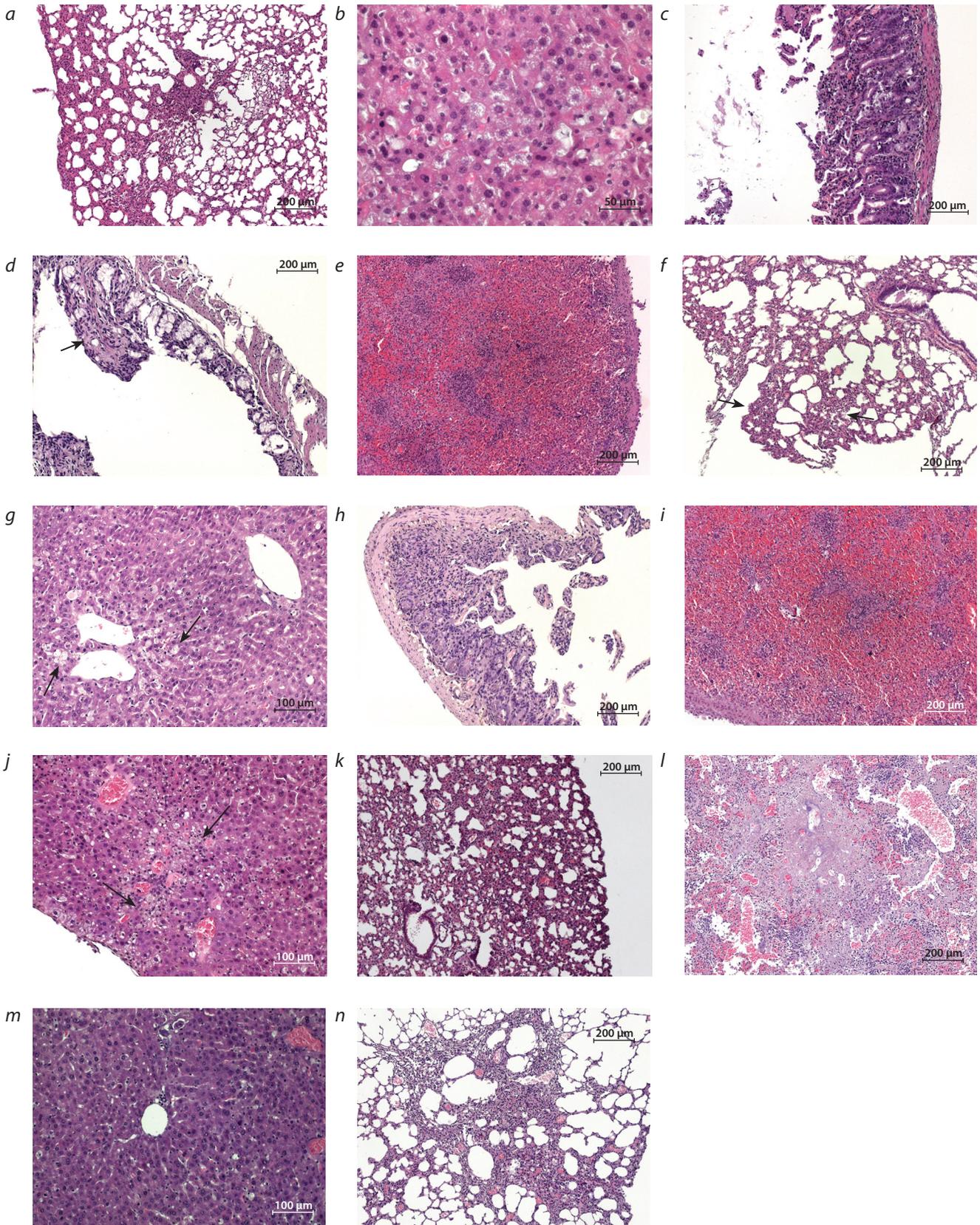


Fig. 1. Histopathology of mouse organs and tissues (first experimental series).
Microscopically examined mouse organs: lungs, liver, small and large intestine, kidney, adrenal gland, and spleen.

Начало гибели мышей в наиболее эффективных группах перекрывается с таковым последних животных в контрольной группе и растянуто во времени. В большинстве случаев формируется вторичный асцит. В единичных случаях мыши погибают с развивающейся солидной опухолью, локализация которой совпадает с направлением введения иглы при инъекциях. Слабая степень развития вторичных и асцита, и солидной опухоли у погибающих мышей предполагает, что гибель животных опосредована другими причинами. Посев асцитной жидкости и крови погибающих животных в определенном числе случаев для следующей серии экспериментов (см. ниже) свидетельствовал о бактериальном заражении жидкостей (данные не приводятся). Гибель мышей и постоянно детектируемое развитие вторичного асцита при прямом воздействии на мыш-асцитноса подразумевали необходимость дополнительных мер. Предполагалось, что гибель мышей опосредована одним или несколькими патологическими процессами, связанными с взаимодействием асцита и препарата дцДНК на фоне инъекций ЦФ. Такими процессами, вероятно, могут быть СВР, сепсис и ПОН, вызванные масштабным апоптозом асцитных раковых клеток. Также губительной для организма могла быть эрозия эпителия кишечника, сопровождаемая как изменением проницаемости гастроэнтерического барьера, так и функциональными нарушениями в доставке питательных веществ в организм (Alyamkina et al., 2015). В этой связи были разработаны и экспериментально опробованы режимы, учитывающие основные особенности воздей-

ствия ЦФ, препарата дцДНК и их сочетания, описанные в наших ранних работах и предыдущем разделе. К таким особенностям можно отнести: способность препарата дцДНК в синергизме с действием ЦФ эрадикаровать СИРК, в монорежиме индуцировать масштабный апоптоз раковых клеток, а также активировать развитие пролиферативного адаптивного иммунного ответа (Alyamkina et al., 2009, 2010a–c, 2012). Одновременно был использован подход с применением трех–четырёх последовательных инъекций ЦФ и препарата дцДНК.

В предыдущей статье цикла (Поттер и др., 2016) было найдено, что регламентированные по времени последовательные инъекции ЦФ воздействуют на раковые клетки по двум независимым векторам. По ходу течения одной из стадий репарации межпочечных шивок (NER, HR) повторная инъекция ЦФ индуцирует несанкционированную (несвоевременную) стадию репаративного процесса. По-видимому, возникает конфликт репаративных молекулярных машин, приводящий к гибели раковой клетки. Также дополнительно инъекции ЦФ проводили в промежуток времени, когда пул клеток, находящихся в первую инъекцию ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла, переходил в G1-S-фазу. Такая обработка затрагивала все клетки в наиболее чувствительную фазу клеточного цикла – S-фазу. И таким образом, терапевтическая схема состояла из чередования инъекций ЦФ и ДНК. Одновременно в дизайн экспериментов для изучаемых животных были введены терапия антибиотиком гентамицином и регламентированная трансплантация ККМ.

Group CP + hDNA (1–12): (a) Lungs. Several animals have subpleural edema, suffusion, decreased airiness, inflammatory cell infiltration involving neighboring parts of parenchyma and accompanied with tissue destruction foci. Taken together, these morphological features are consistent with pleuropneumonia. (b) Liver. All animals of the group show diffuse granular degeneration of hepatocytes, sometimes progressing into ballooning degeneration. Inflammatory cell reaction is not detectable. (c) Small intestine. In one animal, villi of the intestinal mucosa appear smoothed, epithelial cells are almost entirely degraded; the stroma displays edema and lymphocytic infiltration. This pattern is morphologically consistent with acute enteritis. (d) Large intestine. In one animal, mucosal lining shows focal sclerosis. Crypts are malformed, some of them are expanded and appear cyst-like. The mucosa surface looks smoothed (arrow). The changes observed can be classified as manifestation of chronic colitis. Kidney and adrenal gland: no overt pathological changes. (e) Spleen. In all animals, white pulp follicles are small and display indistinct zonation.

Group CP + hDNA (18–30): (f) Lungs. Inflammation foci are small, looking like local swelling in several samples; lymphocyte and neutrophil infiltration, moderate decrease in airiness (dyspnea-type, arrow). (g) Liver. All animals consistently display vacuolar degeneration (arrows). (h) Small intestine. One sample displays signs of profound mucosal layer swelling, residual villi, and pronounced inflammatory cell infiltration combined with progressive fibrosis. This set of morphological changes is consistent with chronic enteritis. Large intestine, kidney and adrenal gland: no pathological changes. (i) Spleen. All spleen samples display hypoplasia of white pulp follicles (functional exhaustion).

Group CP + ICL-hDNA (1–12): (j) Liver: in contrast to the above-mentioned groups, pathological changes in the liver tissue of these animals are much more pronounced and some are classifiable as necrobiosis (arrows). The necrobiotic zones display loss of cell borders between hepatocytes and complete disintegration of their cytoplasmic structure. These zones are readily identifiable on the slides as displaying homogeneous eosinophilic staining. Additionally, profound inflammatory changes are seen in lung and spleen tissues of some animals. (k) Lungs: focal pneumonia is present, and the affected volume is rather large in two of the three samples. (l) Spleen. Necrosis of the spleen pulp is found in two cases. Additionally, tumor cells are found scattered around the capsule edge, but these cells do not appear to spread into deeper cell layers. No morphological changes are observed in other organs or tissues studied.

Group CP + ICL-hDNA (18–30): (m) Liver. Two animals from this group display pronounced liver pathology appearing as necrobiotic foci. (n) Lungs. In one animal, necrobiotic foci are accompanied by local inflammation sites. Other organs display pathological changes basically similar to those described above.

Group CP. Much as in the animals from the treated groups, the following problems in the organs are noted: pronounced degeneration of hepatocytes, presence (in one of two cases) of small inflammatory foci in the lungs, notable hypoplasia of lymph follicles in the white pulp of the spleen, and signs of chronic colitis.

Conclusion: Histopathological changes are found in all experimental mouse groups. Effects of the treatments are most evident from lesions in the liver and spleen, as well as from inflammatory changes in the lungs of several mice. The strongest change is observed in the liver. It appears as necrobiosis in groups CP + ICL-hDNA (1–12) and CP + ICL-hDNA (18–30). Characteristic inflammatory changes in lungs occur in all animals, including the control group. These changes are the most pronounced in the groups CP + hDNA (1–12) and CP + ICL-hDNA (1–12), where the inflammatory foci are the largest, involving pleural tissue. The extreme reduction in the size of lymph follicles of the spleen is observed in all experimental animals, and it is likely attributable to the functional immaturity of this organ. We speculate that just for this cause no dynamics in the morphology was observed throughout the experiment. Follicles with the typical structure are absent, and the compensatory hyperplasia of the follicles is undetectable. In addition to the pathological changes in the spleen that are common to all the mice, pulp necrosis is seen in group CP + ICL-hDNA (1–12). Pathological changes in the liver and spleen are particularly deep in group CP + ICL-hDNA (1–12), where they progressed to the stage of necrosis.

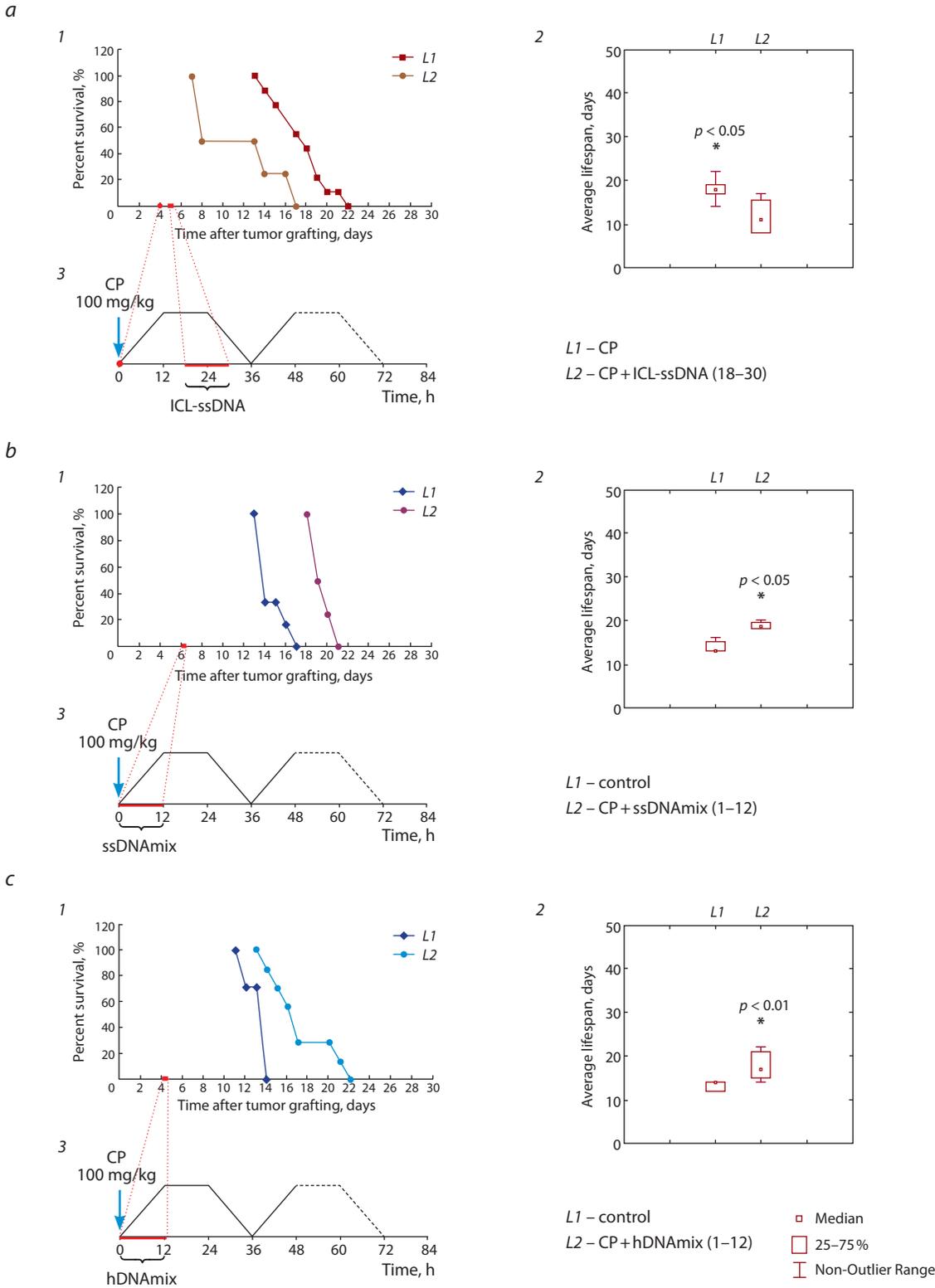


Fig. 2. Analysis of the synergistic activity of the CP cytostatic (100 mg/kg) and various combinations of hDNA, ICL-hDNA, ssDNA, and ICL-ssDNA against the ascites form of Krebs-2 tumor: 1, survival of ascites-engrafted mice; 2, average lifespan of animals having received the treatments (Mann-Whitney U-test); 3, the drug delivery protocol.

(a) CBA mice with established 4-day old Krebs-2 ascites received injections of CP alone (curve L1) or CP followed by the cross-linked ssDNA (ICL-ssDNA) preparation 18–30 hrs later (curve L2); (b) CBA mice with six-day Krebs-2 ascites grafts were treated with CP alone (curve L1, control) or CP followed with a 3 : 1 mixture of native and crosslinked ssDNA (ssDNA/ICL-ssDNA 3/1) 1–12 hrs later (curve L2). (c) C57Bl mice with 4-day Krebs-2 ascites were treated with CP and a mixture of native and cross-linked hDNAs (hDNA/ICL-hDNA 3/1) 1–12 hrs after the CP injection (curve L2) in comparison with the control (curve L1).

Характеристика режимов синергичного воздействия нескольких инъекций циклофосфана и различных сочетаний нативной и кросс-линкированной ДНК человека и лосося, приводящих к полной регрессии первичного асцита Krebs-2.

Четвертая серия экспериментов

Проведенные в настоящей серии эксперименты показали, что введение антибиотика гентамицина в режимы терапии приводит к увеличению СПЖ животных в группах. Обработка экспериментальных животных с использованием трех или четырех инъекций ЦФ и hDNAmix в нескольких режимах полностью разрушает перевитый первичный асцит. Развитие вторичного асцита в группах происходило последовательно с задержкой от 2 до 5 сут для каждого последующего заболевшего животного. Причем для нескольких режимов первичный асцит элиминировался у всех животных группы, а фаза полной ремиссии для последнего животного в группе составляла около 30 сут (рис. 4, *a2*, кривая *L3*). Контрольные мыши при этом погибли синхронно от развитого асцита на 18-е сутки эксперимента (рис. 4, *a1*, кривая *L1*). Вторичный асцит в наиболее демонстративном варианте появился на 36-е сутки эксперимента. В нескольких случаях вторичная опухоль в принципе не появилась до гибели животных (35, 41, 43-и сутки для обсуждаемой серии экспериментов). Несколько животных в различных группах демонстрировали отсутствие асцита и одновременно развитие солидного трансплантата с локализацией или в перитонеуме, или в некоторых внутренних органах. Этот факт, а также последовательное появление вторичного асцита во всех группах животных означали, что проведенные *in vivo* обработки количественно изменяют опухолевый потенциал асцитного графта и что существует фактическая возможность добиться полного излечения мышей от асцита. Главная трудность в решении такой задачи заключается в том, что, как предполагается, часть СИРК сохраняется в тканях или заносится в результате инъекций в ткани, где их внутритканевая локализация предохраняет эти клетки от воздействия терапевтических обработок. Сохраненные таким образом клетки и являются источником вторичной солидной опухоли и рецидива асцита.

Комбинирование воздействия циклофосфана и препаратов дцДНК с терапией антибиотиком, активацией адаптивного иммунитета и пересадкой клеток костного мозга на развитый асцит Krebs-2.

Пятая серия экспериментов

В этой серии экспериментов была предпринята попытка объединить в одной группе описанные эффективные режимы и препараты. Одновременно были сформированы группы, в терапию которых была введена обработка мышей препаратом «Панаген» в режиме, активирующем развитие противоракового АИ (Alyamkina et al., 2009, 2010a–c, 2012). Также животным проводили регламентированную пересадку ККМ (рис. 4, *b3*). Регламент инъекций наиболее эффективного режима был следующий: четыре инъекции ЦФ (0, 20, 36, 56 ч по 100, 50, 100 и 50 мг/кг соответственно), введение hDNA и ssDNAmix в режимах 1–18 (36–56) и 20–36 (58–72) каждые три часа, соответственно, относительно первого введения ЦФ. Был

воспроизведен эффект полного ухода асцита и развития фазы ремиссии у всей группы животных (рис. 4, *b2*, кривая *L4*, кривая *L5*). Однако, как и в предыдущих экспериментах, мыши гибли. Размер и состояние вторичного асцита снова позволили предположить, что гибель мышей не связана с асцитом как таковым. Это наблюдение могло означать, что даже при терапии антибиотиком гентамицином и пересадке ККМ в организме индуцируются патологические процессы, приводящие к гибели животных.

Оказалось, что при использовании комбинированных форм препарата дцДНК уровень разрушительного действия на органы экспериментальных животных в значительной степени ниже, чем при использовании только модифицированной (кросс-линкированной) ДНК. Подтверждением этого явился патоморфологический анализ тканей и органов нескольких животных из экспериментальных групп (рис. 5). Именно этот режим в дальнейшем был взят за основу терапевтической процедуры лечения асцитного рака Krebs-2. Главными в этом режиме были два обстоятельства: 1) три обязательные инъекции ЦФ, дополнительно воздействующие в G1-S-фазе клеточного цикла на клетки, находящиеся в момент предыдущей инъекции ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла; 2) введение композиции двух типов ДНК, одна из которых, как было доказано в первых разделах цикла, действует разрушительно на опухолевый потенциал перевиваемого графта (СИРК) в фазе NER репарации межпочечных шивок (МЦС), а вторая с тем же эффектом воздействует на опухолевый потенциал трансплантата (СИРК) в фазе NR.

Вторая группа животных этой серии экспериментов не продемонстрировала исчезновения асцита в 100 % случаев (рис. 4, *b2*, кривая *L2*), регрессия наблюдалась только у двух мышей. Интересным оказалось то обстоятельство, что одно животное в этой группе прожило без признаков опухоли до 230-х суток эксперимента. Тем не менее асцит все же проявился и мышь погибла. Однако перевитый асцит, взятый от этой мыши (клетки были живыми и нормальными при цитологическом анализе), не дал ни солидного, ни асцитного повторного трансплантата. Перевиваемая доза составляла 10 млн клеток, что с неизбежностью должно было дать графт. Этот факт свидетельствовал о том, что развившийся асцит был не раковой природы. Полученный результат являлся первым примером полного вылечения экспериментального животного от асцита Krebs-2 с использованием разрабатываемого подхода.

Апробация метода терапевтической обработки циклофосфаном и препаратами ДНК человека и лосося асцита Krebs-2 *ex vivo*.

Шестая серия экспериментов

Разрушение первичного асцита и длительная задержка появления вторичного асцита у всей группы экспериментальных мышей позволили предположить, что проведенные обработки оказывают воздействие на СИРК. Растворное во времени появление вторичных опухолей свидетельствовало, что произошло количественное изменение числа опухолевых клеток асцита или признака опухоленности. Как уже было сказано, постоянно повторяющееся появление вторичных опухолей могло

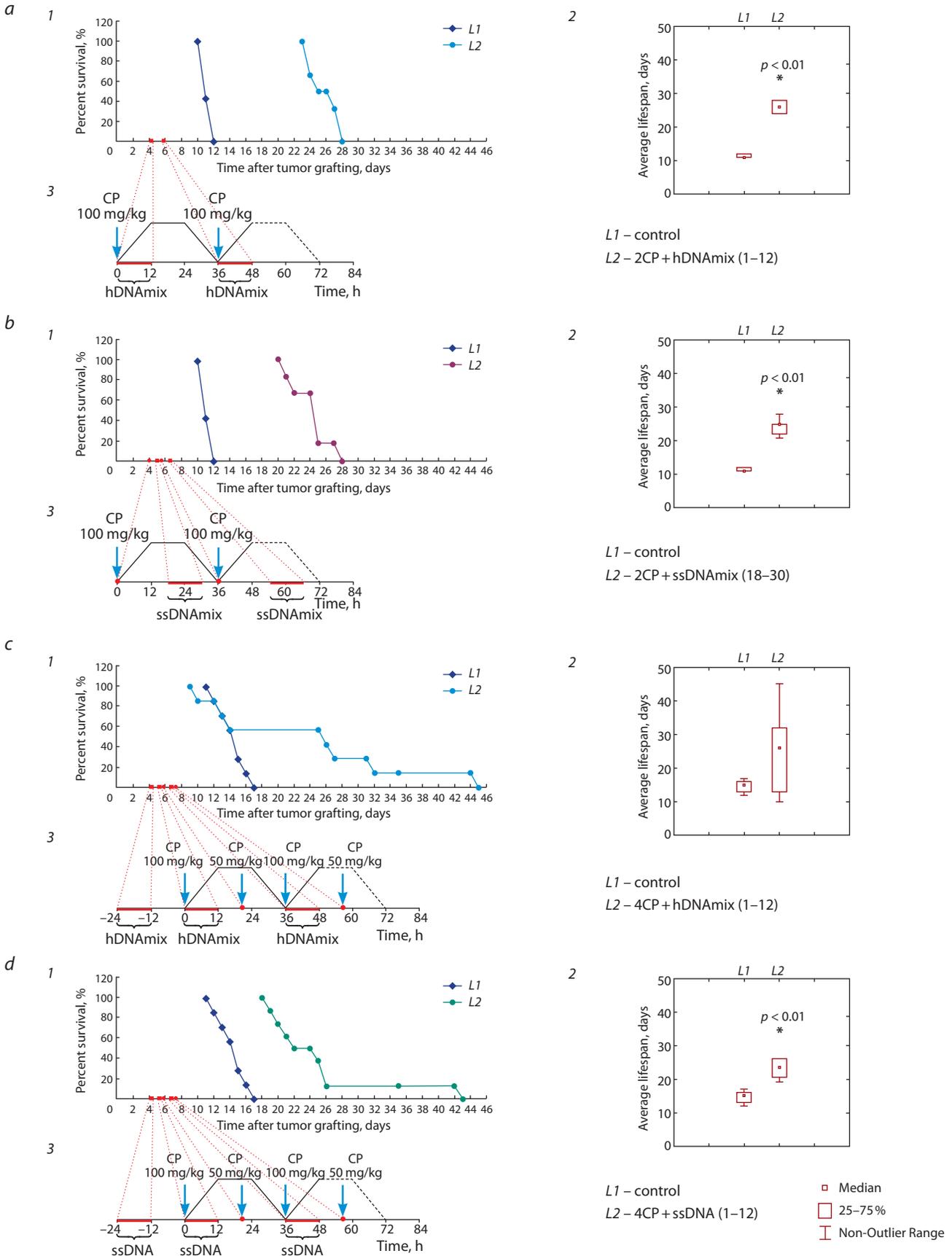


Fig. 3. Test of different schedules of CP and DNA co-administration to treat established Krebs-2 ascites in mice. The treatments result in partial regression of ascites, remission, and a longer lifespan of ascites-engrafted animals. 1, survival plot for ascites-engrafted mice; 2, average lifespan of animals receiving the treatments (Mann-Whitney U-test); 3, drug delivery protocol.

быть связано с несколькими причинами. Инъекции ДНК проводятся мышам с развившимся в организме животного асцитным раком. Предполагается, что СИРК Кребс-2 обладают способностью индивидуализироваться от опухолевой массы и проникать в другие ткани организма, где они становятся недоступными для атаки фрагментами экстраклеточной интродуцированной ДНК. Также была возможна контаминация тканей брюшной полости СИРК в результате многократных терапевтических прокалываний брюшной стенки. И таким образом, последовательное растянутое во времени появление вторичного асцита может быть обусловлено числом клеток, находящихся в глубине тканей организма и оказавшихся недоступными для прямого контакта с фрагментами дцДНК.

Для проверки этих предположений разработали методику, предполагающую полное и своевременное воздействие на асцитные раковые клетки фрагментами дцДНК в результате одноразового контакта в системе *ex vivo*. В качестве препаратов ДНК выбрали дцДНК человека и лосося в смеси с модифицированной кросс-линкированной формой. Для обработки взяли 200 млн клеток, что соответствовало количеству, содержащемуся в четырехдневном асците (~1,25 мл). Для одних групп первую из 12 обработок препаратом ДНК делали вне организма животного, после чего обработанный *ex vivo* асцит реинтродуцировали в перитонеальную полость мышей той же линии, и мыши получали остальные инъекции препаратов. Другим группам животных клетки опухоли прививали одновременно с первой инъекцией препаратов hDNA или ssDNA. Режимы дальнейших инъекций препаратов дцДНК выбирали в соответствии с ранее полученными результатами (рис. 6, 3).

Оказалось, при использовании большинства режимов в организме животных развиваются катастрофические деструктивные процессы, приводящие к их скоротечной гибели. Во всех группах мыши погибли в течение 3–7 сут после инъекции обработанного асцита (данные не приводятся). В группе мышей «ЦФ + ssDNAmix (1–12) *in vivo*» гибель животных была растянута во времени до 19 сут от момента прививки асцита, у одного животного в течение трех дней даже наблюдали ремиссию опухоли (рис. 6, 1, кривая L2; 2, кривая L2). Для режима «ЦФ + асцит (через 18 ч после ЦФ) + ssDNAmix (18–30)» токсический эффект не проявился. Асцит развивался медленно, мыши гибли последовательно от развитого асцита с 13-х по 42-е сутки (рис. 6, 1, кривая L3, данные также были упомянуты в работе Поттер и др., 2016, рис. 2, в5 для описания режимов воздействия разных препаратов ДНК). Одна мышь была умерщвлена в агонистической фазе симптомокомплекса, у нее полностью отсутствовали признаки асцита или

солидного образования в брюшной полости. У двух мышей вторичный асцит не начал развиваться до 27-го дня от введения обработанного графта (рис. 6, 2, кривая L3). У одного из этих животных при терапевтических инъекциях препарата дцДНК к 24-му дню от начала эксперимента в месте введения иглы сформировался вторичный солидный трансплантат с несколькими узлами вдоль следа введения иглы (рис. 6, 5). Максимальная продолжительность жизни одной мыши составила 42 дня. СПЖ в этой группе в четыре раза превосходила таковую в контроле.

Обсуждение

Данные, полученные в опытах по лечению мышей с экспериментальным асцитным раком Кребс-2, согласуются с результатами ранее проведенных нами исследований, представленных в публикациях (Dolgova et al., 2014; Alyamkina et al., 2015; Поттер и др., 2016), и могут быть суммированы в следующих выводах.

Вывод 1. В настоящей работе удалось подобрать эффективные режимы, позволяющие полностью вылечить первичный асцит. Время ремиссии опухоли для последней мыши в различных экспериментах составляло до 30 сут. При этом все контрольные мыши погибали в промежутке 5–18 сут после прививки опухоли в зависимости от эксперимента. Наиболее демонстративными являются эксперименты по перевивке 200 млн клеток и терапии с использованием режима «ЦФ + асцит (через 18 ч после ЦФ) + ssDNAmix (18–30)». В данном случае нам удалось увеличить СПЖ мышей в четыре раза по сравнению с контролем и другими режимами и показать, что у животных ремиссия асцита может продолжаться более 30 сут после гибели всех животных от асцита в контрольной группе. Тем не менее, как показывают эксперименты, наиболее значимым терапевтическим эффектом обладают режимы введения нескольких инъекций ЦФ и комбинации двух препаратов дцДНК, направленных на интерференцию двух различных репаративных систем, NER и HR, или воздействующих на СИРК, находящихся в настоящей S-фазе и избежавших действия предыдущего цикла терапии в нечувствительной M-фазе. Подобранные условия позволили добиться полной ремиссии у всех животных группы, которая продержалась 9 сут (рис. 4, б2, кривая L5).

Вывод 2. Несмотря на существенное увеличение продолжительности жизни мышей, только в единственном случае нам удалось задержать развитие вторичного рака на 230 сут (пятая серия экспериментов), после чего асцит, имеющий нераковую природу, все же проявился и мышь погибла.

(а, б) C57Bl mice with 4-day ascites received two injections of CP at 0 hrs and 36 hrs timepoints (100 mg/kg) followed by either native/crosslinked hDNA mix (hDNA/ICL-hDNA 3/1) or native/crosslinked ssDNA mix (ssDNA/ICL-ssDNA 3/1) 1–12 hrs after CP (curve L2). Control mice received no DNA injections (curve L1); (в, г) CBA mice bearing 4-day Krebs-2 ascites received a series of CP injections (at timepoints 0, 20, 36, and 56 hrs and doses 100, 50, 100, 50 mg/kg, respectively) (curve L1, control). Experimental CBA mice with the tumor received a combination of CP injections with either native/cross-linked hDNA mix (hDNA/ICL-hDNA 3/1) or native/cross-linked ssDNA mix (ssDNA/ICL-ssDNA 5/3), respectively. Injections of DNA preparations were done at 1–12 h after the CP injection at time 0 and 24 h prior to the first CP injection (curve L2) in comparison to the control CBA mice (curve L1).

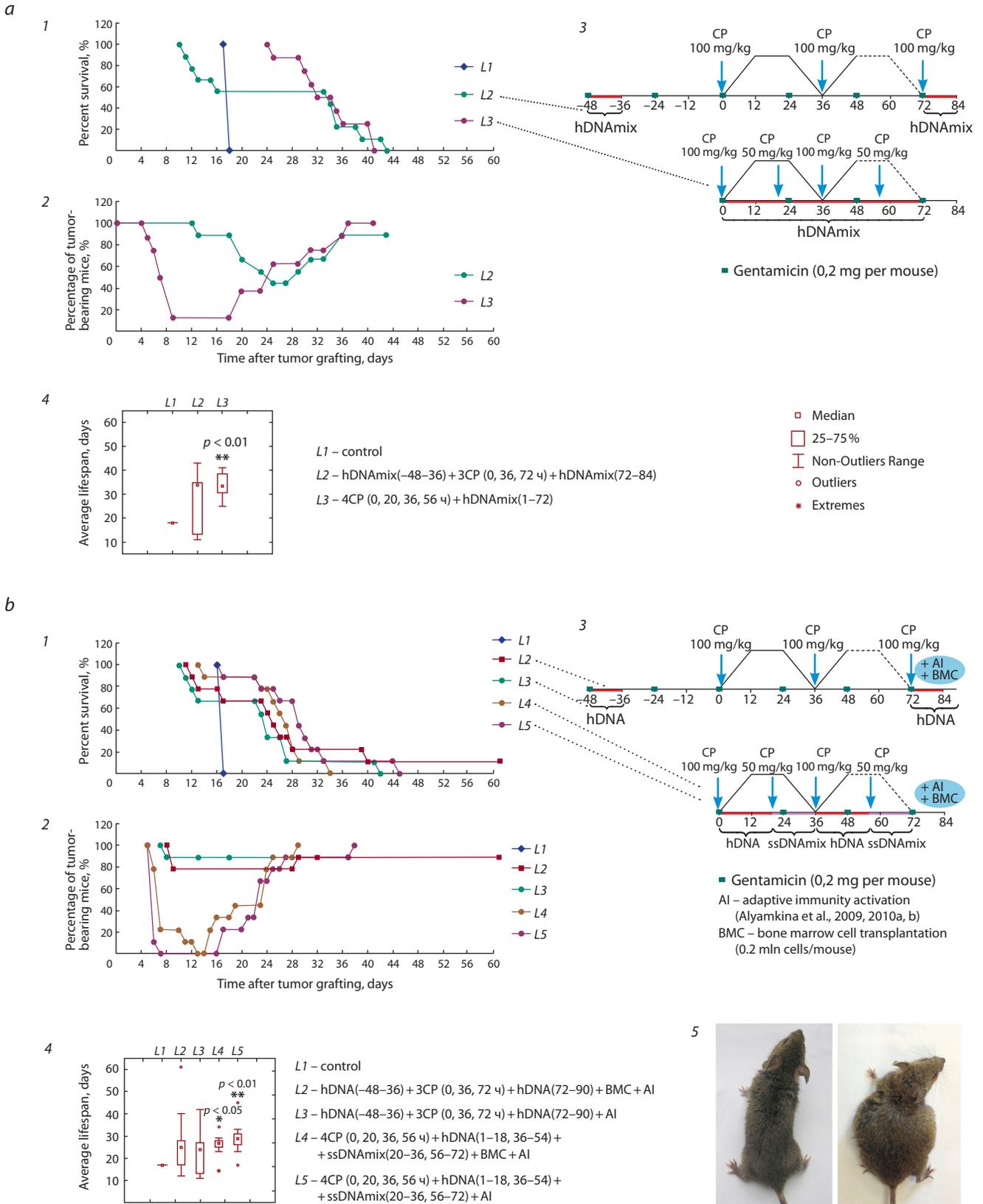


Fig. 4. Various therapeutic protocols combining CP and DNA preparations to eliminate the ascites form of Krebs-2 tumor from mice: 1, survival plot for animals from control and experimental groups receiving the treatments indicated; 2, remission in experimental animals; 3, treatment schedules (CP + DNA + additional protocol modifications, including adaptive immunity activation (AI) and bone marrow transplantation (BM)); 4, average lifespan of the treated animals (Mann-Whitney U-test). All experiments were done with CBA animals.

Принципиально можно было предположить несколько возможностей индукции развития ракового (но не связанного с СВР или иным) асцита после обработки препаратом дцДНК, когда на СИРК не оказывается терапевтического элиминирующего воздействия:

- 1) признак интернализации дцДНК, являющийся причиной разрушения туморогенного начала предполагаемых СИРК в синергизме с ЦФ, характерен не для СИРК, а для их коммитированных потомков, а значит, причинная клетка остается интактной;
- 2) не вся популяция СИРК в силу биологических особенностей в один и тот же момент времени способна интернализировать фрагменты дцДНК и, следовательно, избежать синергической элиминации;
- 3) возможно, что, как показано в работе (Dolgova et al., 2013) на стволовых клетках крови, СИРК также могут на время терять туморогенность, а затем восстанавливать ее;
- 4) развитие вторичного асцита также может быть связано с тем, что в определенных случаях не все СИРК «асцитного бульона» разрушаются или меняют свой раковый статус. Это возможно в том случае, когда проведенные обработки не перекрыли в полной мере промежуток времени разрешения интермедиатов, в течение которого происходит интерференция репаративного процесса с последующим разрушением или клетки, или ее свойств, например отрезок времени между 12 и 18 ч;
- 5) известно, что раковые клетки способны к реверсивному перерождению, что означает, что коммитированная раковая клетка в силу определенных причин способна вернуться к фенотипу СИРК (Gupta et al., 2011);
- 6) возможна ситуация генетической трансформации (генометастазирования) стволовых клеток организма мыши генетическим материалом огромного числа погибших раковых клеток асцита Кребс-2 (Garcia-Olmo et al., 2000).

В этих случаях предлагаемым способом принципиально невозможно убить такую клетку и требуются дополнительные варианты воздействия на нее. Тем не менее результаты, приведенные в статьях настоящего цикла, свидетельствуют, что если раковые клетки доступны для действия ЦФ + дцДНК, то благодаря проведенной обработке можно полностью эрадикаровать туморогенный потенциал таких клеток. Это означает, что можно полностью элиминировать или изменить раковый статус СИРК, что приведет к эрадикации первичного асцита и невозможности развития вторичного.

Существуют также две другие возможности сохранения СИРК в тканях организма мыши. Асцитные раковые стволовые клетки в период прорастания перевитого асцитного трансплантата проникают в ткани, где они

становятся недоступными для действия препарата дцДНК (Parsons et al., 1982). Также существует вероятность, что при многократных проколах перитонеальной стенки у мышей в период терапевтических процедур часть СИРК вместе с перемещением иглы доставляется в прокляываемые ткани, где клетки фиксируют свое местоположение и становятся недоступными для дальнейшего воздействия.

Результаты проведенного исследования в большей мере предполагают, что появление вторичных опухолей связано как с механическим загрязнением перитонеальных тканей СИРК, которые в этом случае становятся недоступными для синергичной терапии, так и с выживанием СИРК. Во многих экспериментах часто наблюдалось появление солидных опухолей в месте ввода иглы при проводимых обработках, которое практически всегда сопровождалось появлением вторичного асцита. Вероятно, что при многократных проколах иглой СИРК захватываются и перераспределяются во внутренних органах мыши, где они недоступны действию препарата дцДНК. Такие клетки и являются возможной причиной развития вторичного ракового асцита. Наглядно такое заражение было продемонстрировано в эксперименте по перевивке 200 млн раковых клеток (рис. 6, 5), в котором четко прослеживаются несколько узлов развития солидной опухоли вдоль пути ввода иглы и появление вторичного асцита.

Вывод 3. Гибель мышей происходит не от вторичных опухолей, а от нескольких одновременно развивающихся патологических процессов. При анализе развития вторичного асцита и соотношении его величины с гибелью животных можно сделать заключение, что гибель мышей не связана с асцитом как таковым. При суммировании результатов всех патоморфологических анализов органов и тканей мышей, погибающих после фазы частичной ремиссии (разные группы из независимых экспериментов текущего раздела цикла исследований), выявлены различные нарушения в структуре тканей и органов (рис. 1).

Патологоанатомический анализ, выполненный для животных, переживших фазу полной ремиссии в развитии асцита (рис. 5), свидетельствует, что примененная терапия является существенно более щадящей для животных, что характеризуется как полной ремиссией основного заболевания, так и увеличением СПЖ.

Характер патологических изменений указывал на развитие в организме экспериментальных животных СВР. Наличие воспалительных процессов определяется на основании гистологического исследования образцов тканей экспериментальных животных. Признаками воспаления со стороны легких являются отек межальвеолярных перегородок, геморрагия, массивная воспалительноклеточная инфильтрация перибронхиальных и периваскулярных

(a) Analysis of the synergistic targeting activity of CP and hDNAmix against 4-day Krebs-2 grafts. Daily injections of gentamicin were added to the treatment schedule. (b) Analysis of the synergistic activity of CP and the hDNAmix/ssDNAmix preparation to eliminate 4-day Krebs-2 grafts from mice. The protocol was supplemented with bone marrow cell transplantation (BM), activation of adaptive immunity (AI), and gentamicin injections to prevent the systemic inflammatory response. 5, Left: A mouse from the hDNA (-48-36) + 3CP (0, 36, 72 h) + hDNA (72-90) + BM + AI group shows no evidence of detectable ascites on day 60 after engraftment. Right: A mouse from the same treatment group on day 39 (one day before death) with a well-developed ascites.

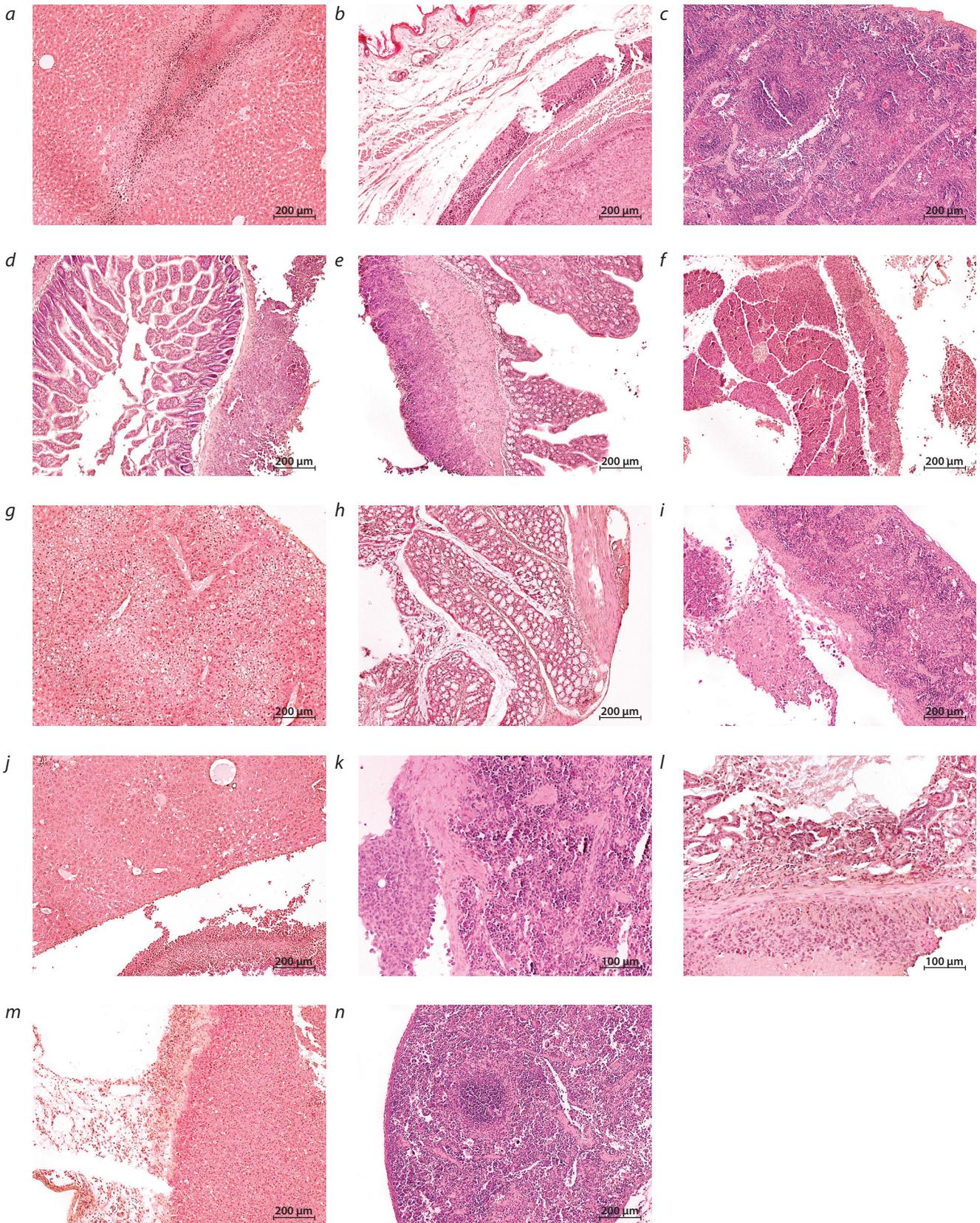


Fig. 5. Histopathology of mouse organs and tissues (15th experimental series). BM, bone marrow cells; AI, adaptive immunity.
Control group. (a) Liver. Tumor metastasis divides the sample section in two parts. The border between the tumor and liver parenchyma is indistinct. No inflammatory reaction is detectable. (b) Abdominal wall. A large tumorous body found in the skin lacking a distinct border that would separate it from the adjacent tissue. Tumor cells themselves are considered the border. Tumor cells invade the surrounding muscles. (c) Spleen. Tumor cells are scattered over

пространств; со стороны печени – деструкция гепатоцитов, мелкие очаги лимфоидноклеточной инфильтрации внутри долек и по ходу портальных трактов. Обнаруженные нами патоморфологические изменения в других органах, как следует из аналогий с патоморфологическими данными, полученными на человеческом материале, также являются следствием масштабного воспалительного процесса. В некоторых случаях посев асцитной жидкости и крови свидетельствовал о мощном инфекционном заражении животных.

Общая картина происходящих событий могла означать, что в ходе проведенных обработок в результате масштабного апоптоза и вторичного некроза асцитных клеток и лимфоцитов, вызванных действием экзогенной дцДНК, индуцируется СВР и разрушается эпителий кишечника. Генерализованное воспаление приводит к иммунному коллапсу, как это следует из патоморфологического анализа органов экспериментальных мышей. Одновременно на фоне эрозии эпителия стенки кишечника разрушается гастроэнтерический барьер и развивается сепсис, что вместе в конечном счете приводит к ПОН и гибели животных. Эрозия эпителия кишечника, по всей видимости, сопровождается существенными нарушениями в усвоении пищи, что приводит к катастрофическому снижению веса животных, что также вносит свой вклад в летальный исход. При этом прослеживается ярко выраженное редуцирующее воздействие на перевитый трансплантат.

В клинической реанимационной практике известно, что аналогичные изменения в органах и тканях человека являются следствием их тяжелейших функциональных нарушений, обусловленных или быстрым масштабным разложением тканей и возникновением СВР, или инфекционным сепсисом, также следующим за СВР. Для того чтобы наиболее полно определить местоположение возникающего вторичного асцита, в идеологии разрабатываемой стратегии необходимо дать краткую характеристику процесса СВР и сепсиса, возникающего

вследствие акцидентального масштабного разрушения тканей организма.

Известно, что масштабное скоротечное разрушение тканей организма и сопровождающий его развивающийся воспалительный процесс приводят к возникновению сепсиса (Bleiblo et al., 2012). В данном аспекте можно построить следующую логическую линию событий, происходящих в организме экспериментальных мышей, прошедших обработку разрабатываемым терапевтическим режимом. Синергичное действие ЦФ и препарата дцДНК приводит к апоптозу нескольких миллиардов раковых клеток, который завершается вторичным некрозом огромной массы апоптотировавших клеток. Перитонеальное пространство животного заполняется ДНК и ее комплексами с белками, и в частности нуклеосомами, что сопровождается развитием СВР и сепсисом.

Известно, что ДНК в любой форме является мощным воспалительным фактором. Показано, что нуклеосомы индуцируют масштабный некроз лимфоцитов (Decker et al., 2003). Также известно, что инъекции большого (1–8 мг/мышь) количества ДНК различного происхождения индуцируют масштабный апоптоз костномозговых предшественников, в некоторых случаях достигающий 98 % (Dolgova et al., 2012). Приводятся данные, что экстракционная ДНК вызывает синтез и секрецию фактора В комплемента и функционально ассоциирует с C1q комплемента (Kaczorowski et al., 2012). В плазме крови всегда функционирует система комплемента. Также в плазме крови, лимфе и интерстициальных жидкостях всегда присутствует определенное физиологическое количество дцДНК (Anker et al., 1999; Jahr et al., 2001; Laktionov et al., 2004). Вместе с этим В-лимфоциты памяти всегда секретуют базовый уровень антител против этих имманентно присутствующих нуклеиновых кислот (Туаева и др., 2006). Вероятно, что этап немедленной реакции на акцидентально появившиеся фрагменты дцДНК связан с двумя независимыми событиями. Установлено, что C1q комплемент

the spleen capsule, forming an interrupted fence-like cell layer. Lungs appear structurally normal. (d) Small intestine. Encased by a large tumor fragment. Other than that, no pathological or structural changes in the small intestine or its wall are seen. (e) Large intestine. The situation is identical to that observed in the small intestine sample. A tumor fragment encases the intestine. Spleen. Atrophy of follicles is notable. (f) Pancreas. Invasive growth of the tumor. Lungs. No visible histopathological changes.

Group hDNA (–48–36) + 3CP (0, 36, 72) + hDNA (72–90) + BM + AI. Lungs: The structural organization of lung parenchyma appears normal. (g) Liver. Diffuse vacuolar degeneration of hepatocytes. Necrotic debris is visible on one of the external surfaces of the organ. (h) Large intestine: changes consistent with necrotizing colitis. The mucosa is completely degenerated.

Group hDNA (–48–36) + 3ЦФ (0, 36, 72) + hDNA (72–90) + AI. Lungs: no pathological changes observed. Cardiac muscle: no pathological changes. Spleen. Splenic lymph follicles are absent. Tumor metastases are scattered over the organ. Some of them appear necrotic. (i) Spleen. Atrophy of white pulp follicles. A metastatic tumor is attached from outside. Liver: no pathological changes. Small intestine: cancer metastasis showing necrotic foci is attached to the serous membrane of the intestine. The organ itself appears normal. Large intestine: structurally normal.

Group 4CP (0, 20, 36, 56) + hDNA (1–18, 36–54) + ssDNA (20–36, 56–72) + BM + AI. Lungs: no pathological changes. (j) Liver. The liver parenchyma is structurally normal. One of the regions of the liver capsule bears a loose attachment site of a cancer metastasis. (k) Spleen. No lymph follicles are detectable. Cancer cells are randomly scattered over the capsule surface. (l) Small intestine. A large metastatic tumor is attached to the serous membrane of the organ. The mucosa of the small intestine is damaged. It appears consistent with necrotizing enteritis. Large intestine: no pathological changes observed.

Group 4CP (0, 20, 36, 56) + hDNA (1–18, 36–54) + ssDNA (20–36, 56–72) + AI. (m) Liver. Necrotic debris, apparently unrelated to the organ itself, is present on the outer surface. No histopathological changes found. The liver is structurally normal. Lungs: parenchyma is structurally normal. (n) Spleen: a white pulp depletion pattern (The whole slide shows a single follicle).

Conclusion. Cancer spread is mostly confined to the abdominal cavity. Metastases in the liver that spread along the serous membranes were found only in the control mice. Cancer cells are invariably found on the serous membranes sheathing abdominal organs: spleen, liver, intestine, pancreas, kidneys. They never cross the connective tissue of the capsule to invade the organ.

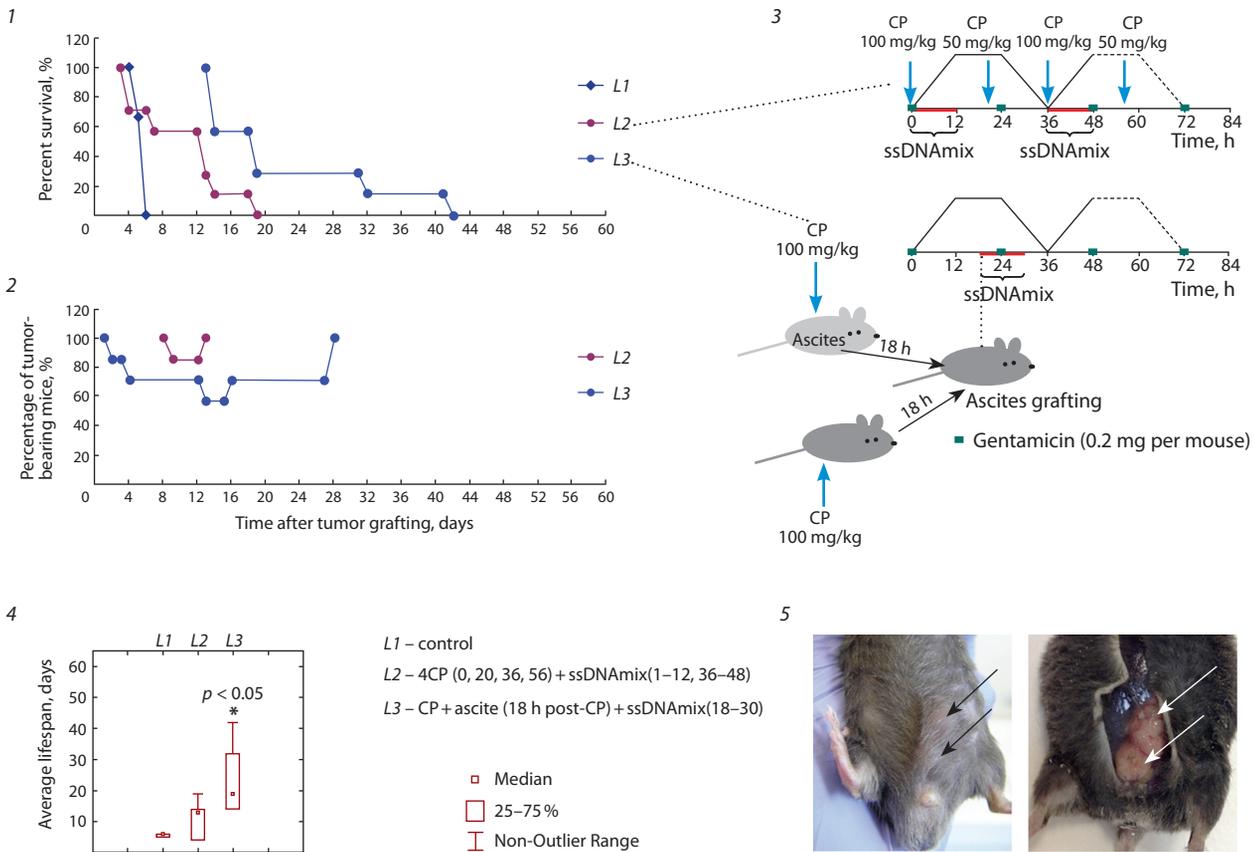


Fig. 6. Analysis of various treatment schedules (CP+/-ssDNAmix) for C57Bl mice injected with 0.2×10^9 Krebs-2 ascites cells with transplants failing to develop into ascites: 1, survival plot for animals from control (CP only) and experimental groups; 2, remission in experimental tumor-bearing animals; 3, treatment schedules; 4, average lifespan (Mann-Whitney U-test); 5, the last surviving mouse from the CP + ascites (18 h post-CP) + ssDNAmix (18-30) group. Left: day 36, solid tumor development. Right: day 42, post-mortem examination of the same mouse. The solid tumor is visible as separate nodules located along the drug injection trajectory, which was the most likely cause of the secondary ascites.

может напрямую связывать фрагменты дцДНК (Jiang et al., 1992; Tissot et al., 2003; Garlatti et al., 2010), и можно предположить, что такая реакция немедленно осуществляется при появлении в организме избытка дцДНК. Антитела против дцДНК также немедленно маркируют появившийся антиген в форме фрагментов дцДНК. Именно в этот момент происходит первая атака на антиген, в которой участвуют система комплемента и антитела к дцДНК. C1q напрямую или через связь с Fs антител, ассоциированных с фрагментами дцДНК, активирует систему комплемента. Не ассоциированный с патогеном дцДНК-C1 комплекс расщепляет цитоплазматический C3, который немедленно связывается с любым близкорасположенным субстратом (мембрана соматической клетки организма) своей реактивной тиоэфирной группой. Формируется мембран-атакующий комплекс (МАК). Происходит лизис собственных клеток, и образуются многочисленные очаги некроза, которые на патологоанатомических срезах выглядят как множественные лимфоидно-клеточные воспалительные инфильтраты (Dolgoва et al., 2012, настоящее исследование). Указанные выше события приводят к усилению

идущего воспалительного процесса и формированию акселеративной петли. Погибшие в результате некроза клетки выбрасывают в околоклеточную среду мощные медиаторы воспаления. Комплекс дцДНК-C1q комплемента запускает активность C3 конвертазы. Повышение уровня циркулирующего фактора В комплемента приводит к более эффективному связыванию любых собственных этому фактору лигандов, а также активации C3 конвертазы на мембранах собственных клеток, что ведет к формированию МАК, осмотическому разрыву клетки и опять к высвобождению медиаторов воспаления. Индуцируется СВР, сопровождаемая синдромом диссеминированного свертывания крови. По мере прогрессирования патологии развивается синдром ПОН, сопровождаемый гибелью животных (Гаврилов, 1981).

В результате работы найден и охарактеризован такой режим воздействия на асцит Krebs-2, при котором происходит полная регрессия асцита, а время ремиссии для всей группы составляет 7-9 сут. Главным в этом режиме являются два обстоятельства: 1) несколько инъекций ЦФ, дополнительно воздействующего в G1-S-фазе клеточного

цикла на клетки, находящиеся в момент предыдущей инъекции ЦФ в G2-M-фазе клеточного цикла, и повторно запирающиеся в S-фазе готовящиеся выйти из нее клетки первой очереди воздействия; 2) введение двух композиций ДНК, одна из которых, как было доказано в первых разделах цикла, действует разрушительно на опухолевый потенциал перевиваемого графта (СИРК) в фазе NER репарации МПС, а вторая с тем же эффектом воздействует на опухолевый потенциал трансплантата (СИРК) в фазе HR.

Продолжение исследования должно быть акцентировано на следующих направлениях.

1. Сокращение до минимума (одно) количества терапевтических прокалываний той части организма мышей, в которой располагается асцитная жидкость (поиск режима единичной инъекции, приводящей к разрушению первичного асцита, подкожные инъекции антибиотика, снижение дозы препаратов дцДНК и, тем самым, частоты их введения за счет ассоциации фрагментов с протаминам (Долгова и др, 2009)).
2. Разработка дополнительных процедур воздействия на вторичный рак и развивающуюся СВР, а именно: иммунотерапия обученными дендритными клетками, Т8+/перфорин+ лимфоцитами или макрофагами и разработка процедур, купирующих развитие СВР и ПОН, на базе реанимационной практики, используемой при лечении аналогичных состояний у человека.

Полученные в настоящей работе результаты предполагают возможность существования режима, технически простого и терапевтически эффективного, позволяющего конечно элиминировать асцит Krebs-2. Успешная доработка терапевтического режима эрадикации асцита Krebs-2 в дальнейшем позволит экстраполировать полученные данные на лечение различных видов злокачественного асцита у человека.

Acknowledgments

This work was done as part of State Contract 0324-2015-0003.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gel'fgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity. *Cell Immunol.* 2010a; 262:120-126. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.01.005
- Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Orishchenko K.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combined therapy with cyclophosphamide and DNA preparation inhibits the tumor growth in mice. *Genet. Vaccines Ther.* 2009;7(1):12. DOI 10.1186/1479-0556-7-12
- Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Gvozdeva T.S., Dolgova E.V., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effects of human exogenous DNA on production of perforin-containing CD8+ cytotoxic lymphocytes in laboratory setting and clinical practice. *Cell Immunol.* 2012;276:59-66. DOI 10.1016/j.cellimm.2012.04.004
- Alyamkina E.A., Leplina O.Y., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Shilov A.G., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on maturation of dendritic cells in vitro. *Cell Immunol.* 2010b;266:46-51. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.08.011
- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Efremov Y.R., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Sidorov S.V., Ponomarenko D.M., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. A strategy of tumor treatment in mice with doxorubicin-cyclophosphamide combination based on dendritic cell activation by human double-stranded DNA preparation. *Genet. Vaccines Ther.* 2010c;8(1)(7). DOI 10.1186/1479-0556-8-7
- Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A.V., Dolgova E.V., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Andrushkevich O.M., Taranov O.S., Omigov V.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kiseleva E.V., Zhukova M.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts. *Cancer Cell Int.* 2015;15(32). DOI 10.1186/s12935-015-0180-6
- Anker P., Mulcahy H., Chen X.Q., Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65-73.
- Bespalov V.G., Zhabin A.A., Stukov A.N., Belyaeva O.A., Murazov Y.G., Semenov A.L., Konkov S.A., Krylova I.M. Synergistic antitumor effect of dioxodate and cisplatin on the model of ovarian ascites tumor. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology.* 2013;1:42-46.
- Bleiblo F., Michael P., Brabant D., Ramana C.V., Tai T., Saleh M., Parrillo J.E., Kumar A. The role of immunostimulatory nucleic acids in septic shock. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012;5. ISSN:1940-5901/IJCEM1112008.
- Blohin N.N., Perevodchikova N.I. *Khimioterapiya opukholevykh zabollevaniy [Chemotherapy of neoplastic diseases]*. Moscow, Meditsina, 1984.
- Brenner D.E. Intraperitoneal chemotherapy: a review. *J. Clin. Oncol.* 1986;4(7):1135-1147.
- Decker P., Wolburg H., Rammensee H.G. Nucleosomes induce lymphocyte necrosis. *Eur. J. Immunol.* 2003;33(7):1978-1987. DOI 10.1002/eji.200323703
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene.* 2013;528(2):74-83. DOI 10.1016/j.gene.2013.06.058
- Dolgova E.V., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Alyamkina E.A., Orishchenko K.E., Rogachev V.A., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Prokopenko A.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Zagrebelny S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. "Delayed death" phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA. *Gene.* 2012;495(2):134-145. DOI 10.1016/j.gene.2011.12.032

- Dolgova E.V., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Likhacheva A.S., Alyamkina E.A., Sebeleva T.E., Chernykh E.R., Gelfgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Leukostimulatory effect of exogenous DNA fragments protected by protamine in mice in the case of myelosuppression caused by cyclophosphamide. *Voprosy onkologii=Problems in Oncology*. 2009;55(6):761-764.
- Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J., Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood*. 2000;95(2):724-725.
- Garlatti V., Chouquet A., Lunardi T., Vives R., Paidassi H., Lortat-Jacob H., Thielens N.M., Arlaud G.J., Gaboriaud C. Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparin sulfate through neighboring sites of its recognition domain. *J. Immunol*. 2010;185(2):808-812. DOI 10.4049/jimmunol.1000184.
- Gavrilov O.K. *Problemy i gipotezy v uchenii o svertyvanii krovi [Problems and Hypotheses in the Study of Blood Coagulation]*. Moscow, Meditsina, 1981.
- Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G., Shapira S.D., Tao K., Kuperwasser C., Lander E.S. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-644. DOI 10.1016/j.cell.2011.07.026
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61(4):1659-1665.
- Jiang H., Cooper B., Robey F.A., Gewurz H. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J. Biol. Chem*. 1992;267(35):25597-25601.
- Kaczorowski D.J., Scott M.J., Pibris J.P., Afrazi A., Nakao A., Edmonds R.D., Kim S., Kwak J.H., Liu Y., Fan J., Billiar T.R. Mammalian DNA is an endogenous danger signal that stimulates local synthesis and release of complement factor B. *Mol. Med*. 2012;18(1):851-860. DOI 10.2119/molmed.2012.00011
- Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*. 2004;23(6-7):879-883.
- Light R.W. *Pleural Disease*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1980. (Russ. ed.: Layt R.U. *Bolezni plevry*. Moscow, Medicina, 1986:106-119).
- Parsons D.F., Marko M., Braun S.J., Wansor K.J. Ascites tumor invasion of mouse peritoneum studied by high-voltage electron microscope stereoscopy. *Cancer Res*. 1982;42(11):4574-4583.
- Potter E.A., Dolgova E.V., Minkevich A.M., Efremov Ya.R., Taranov O.S., Omigov V.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Vereschagin E.I., Kozel A.V., Rogachev V.A., Petrov D.B., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Therapeutic effects of cyclophosphamide, dsDNA preparations and their combinations against Krebs-2 ascites cancer cells and various cancer transplants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(1):96-107. DOI 10.18699/VJ15.116
- Stenina M.B. Controversial issues in the treatment of ovarian cancer. *Trudnyy patsient: spetsvypusk "Onkologiya"=An inveterate patient: Oncology*. 2006;4(11):9-14.
- Tissot B., Daniel R., Place C. Interaction of the C1 complex of the complement with sulfated polysaccharide and DNA probed by single molecule fluorescence microscopy. *Eur. J. Biochem*. 2003;270(23):4714-4720.
- Tuaeva N.O., Sofronov V.V., Amikeeva V.A., Abramova Z.I., Winter V.G., Mustafina D.M., Tutochkina K.V. Interconnection of extracellular DNA concentration in blood plasma and amount of antibodies to native DNA in newborns with pneumopathy. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal=Kazan Medical Journal*. 2006;87(4):254-257.
- Volkova O.V., Eleckii Yu.K. *Osnovy gistologii i gistologicheskoy tekhniki [The Fundamentals of Histology and Histological Technique]*. Moscow, Meditsina, 1971.

ДНК-штрихкодирование: сколько видов дождевых червей живет на юге Западной Сибири?

С.В. Шеховцов¹, Н.Э. Базарова^{1, 2}, Д.И. Берман³, Н.А. Булахова^{3, 4}, Е.В. Голованова⁵, С.В. Коняев⁶, Т.М. Кругова⁷, И.И. Любечанский⁶, С.Е. Пельтек¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук», Магадан, Россия

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный педагогический университет», Омск, Россия

⁶ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

⁷ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный природный заповедник «Тигирекский»», Барнаул, Россия

Дождевые черви – широко распространенная и экологически важная группа. Представители ее занимают первое место по суммарной биомассе в некоторых экосистемах и зачастую определяют видовой состав всей почвенной фауны. В ряде работ зарубежных исследователей было показано, что для дождевых червей характерна значительная скрытая генетическая изменчивость. В некоторых случаях внутри одного морфологического вида обнаруживается несколько видов-двойников. В данной работе была сделана попытка оценить видовое разнообразие дождевых червей юга Западной Сибири с помощью метода ДНК-штрихкодирования (DNA barcoding). ДНК-штрихкодирование заключается в использовании коротких фрагментов генома для идентификации видов и позволяет работать с образцами, которые не могут быть достоверно определены традиционными способами, а также находить новые виды и приблизительно устанавливать их систематическое родство. В качестве целевой последовательности был взят фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (*cox1*) длиной 658 п. н., амплифицированный при помощи универсальных праймеров. Считается, что на изучаемой территории (Новосибирская и Томская области, Алтайский край, Республика Алтай) обитает 16 видов и подвидов дождевых червей; все они относятся к семейству Lumbricidae. Проанализировано 259 особей дождевых червей из 12 географических пунктов. Обнаружено 27 генетических кластеров, 10 из которых соответствуют видам *A. caliginosa*, *E. fetida*, *O. tyrtaeum*, *D. r. tenuis*, *D. octaedra*, *E. balatonica*, *E. sibirica*, а также трем ранее известным генетическим линиям *E. nordenskioldi nordenskioldi*. Последовательности 17 из 27 кластеров не имеют сходства с известными видами дождевых червей. Часть червей новых кластеров морфологически близка к группе видов *Eisenia n. nordenskioldi* / *E. n. pallida* и, скорее всего, представляет новые генетические линии этого комплекса. Некоторые кластеры, вероятно, являются новыми, ранее не обнаруженными, видами. Таким образом, значительная часть разнообразия дождевых червей юга Западной Сибири еще не охарактеризована.

Ключевые слова: дождевые черви; Lumbricidae; Западная Сибирь; ДНК-штрихкодирование; *cox1*; цитохромоксидаза 1.

DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia?

S.V. Shekhovtsov¹, N.E. Bazarova^{1, 2}, D.I. Berman³, N.A. Bulakhova^{3, 4}, E.V. Golovanova⁵, S.V. Konyayev⁶, T.M. Krugova⁷, I.I. Lyubechanskiy⁶, S.E. Peltek¹

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

² Novosibirsk State Agriculatural University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, Magadan, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁵ Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

⁶ Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁷ Tigirek State Natural Reserve, Barnaul, Russia

Earthworms are a widespread and ecologically important group of animals, which has the highest total biomass in some ecosystems and often defines the composition of soil fauna. Earthworms are known to have high cryptic genetic diversity. In this study we attempted to estimate earthworm species diversity in the south of West Siberia by DNA barcoding. This method employs short fragments of the genome to identify species, and allows one to work with specimens that cannot be identified by conventional techniques, as well as to search for new species and predict their phylogenetic affinity. As the target sequence we took a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (*cox1*) gene. The studied territory (Novosibirsk and Tomsk oblasts, Altai krai, and the Altai Republic) is known to contain 16 species and subspecies of earthworms. We analyzed 259 individuals from twelve locations and detected 27 genetic clusters. Ten of them correspond to known species (*A. caliginosa*, *E. fetida*, *O. tyrtaeum*, *D. r. tenuis*, *D. octaedra*, *E. balatonica*, *E. sibirica*, as well as three genetic lineages of *E. nordenskioldi nordenskioldi*). Seventeen of the 27 clusters do not have close sequence similarity to any known earthworm species. Representatives of some of these novel clusters are morphologically similar to the *Eisenia n. nordenskioldi* /

E. n. pallida species complex and may belong to new genetic lineages of this complex. The rest of the novel clusters probably represent new earthworm species. Therefore, we can conclude that a large portion of earthworm biodiversity in the south of West Siberia is still unexplored.

Keywords: earthworms; Lumbricidae; West Siberia; DNA barcoding; *cox1*; cytochrome oxidase.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шеховцов С.В., Базарова Н.Э., Берман Д.И., Булахова Н.А., Голованова Е.В., Коняев С.В., Кругова Т.М., Любечанский И.И., Пельтек С.Е. ДНК-штрихкодирование: сколько видов дождевых червей живет на юге Западной Сибири? Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):125-130. DOI 10.18699/VJ15.110

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shekhovtsov S.V., Bazarova N.E., Berman D.I., Bulakhova N.A., Golovanova E.V., Konyaev S.V., Krugova T.M., Lyubechanskii I.I., Peltek S.E. DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia? Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):125-130. DOI 10.18699/VJ15.110

Дождевые черви, как известно, – важная в экологическом отношении группа. Мировая фауна содержит относительно немного видов, около 3 700 (Hendrix et al., 2008), из которых в России обнаружены только 47 (Всеволодова-Перель, 1997). Одна из причин столь малого разнообразия – небольшое число морфологических диагностических признаков, что связано с образом жизни червей. Обитание в почве накладывает ограничения на морфологическую изменчивость. Диагностическими признаками для дождевых червей служат положение пояса и половых отверстий, форма головной лопасти, число и расположение (сближенность) щетинок, иногда размер и окраска тела. Зачастую эти признаки эволюционируют конвергентно у разных видов и групп, и напротив, возможна значительная внутривидовая изменчивость.

Самая полная и наиболее часто используемая сводка по дождевым червям нашей страны – кадастр дождевых червей России – составлена Т.С. Всеволодовой-Перель (1997). В этом источнике для азиатской России приводится 28 видов и подвидов дождевых червей. На рассматриваемой в данной работе территории (Новосибирская и Томская области, Алтайский край, Республика Алтай) обитает 16 видов дождевых червей. Все они относятся к семейству Lumbricidae. Восемь из них – инвазивные виды-космополиты (*Allolobophora parva*, *Dendrodrilus rubidus tenuis*, *D. r. subrubicundus*, *Octolasion tyrtaeum* (= *O. lacteum*), *Aporrectodea caliginosa*, *Dendrobaena octaedra*, *Eiseniella tetraedra* и *Eisenia fetida*). Для Западной Сибири указаны также *Lumbricus terrestris*, *L. castaneus*, *L. rubellus* и *Aporrectodea rosea* (Стриганова, Порядина, 2005); однако, по мнению Т.С. Всеволодовой-Перель, обнаружение двух последних видов является ошибкой определения. Четыре вида рода *Eisenia* (*E. malevici*, *E. altaica*, *E. salairica* и *E. tracta*) – эндемики Алтая и Салаирского кряжа. Оставшиеся пять видов – это близкородственная группа *Eisenia n. nordenskioldi*/*E. n. pallida*/*E. atlavinytaeae*, широко распространенная по всей Сибири, а также более редкие виды *E. sibirica* и *E. balatonica*.

Нельзя не отметить резкий контраст между весьма небольшим видовым разнообразием (по сравнению с большинством других групп животных, распространенных на той же территории) и огромной общей биомассой и экологической значимостью этой группы.

Между тем уже одна из первых работ, проведенных на дождевых червях методами ДНК-штрихкодирования (DNA barcoding) (King et al., 2008), показала, что для большинства видов характерна весьма значительная скрытая изменчивость. В пределах нескольких широко распространенных видов, исследованных King с коллегами, было найдено от двух до пяти криптических генетических линий, заметно отличающихся друг от друга: число парных замен между этими линиями составляло до 22 %. Подобная картина была обнаружена и в последующих исследованиях как на отдельных видах дождевых червей, так на обширных их выборках (Pérez-Losada et al., 2012; Rogco et al., 2013).

ДНК-штрихкодирование заключается в использовании коротких фрагментов генома для идентификации видов (Hebert et al., 2003). Наиболее часто используемая для ДНК-штрихкодирования последовательность у животных – митохондриальный ген цитохромоксидазы I (*cox1*, COI). Этот метод очень полезен при исследовании образцов, которые не могут быть достоверно определены традиционными способами, например, ювенильных особей, коконов (Richard et al., 2010), фрагментов организмов или же следов их жизнедеятельности (фекалии, содержимое желудка и т.д.), ДНК, выделенной из образцов почвы (Bienert et al., 2012). Применяется он также и для групп, содержащих большое количество трудно определяемых видов, или же для таких, систематика которых плохо разработана. ДНК-штрихкодирование имеет более ограниченные задачи, чем молекулярная филогения, которые не включают в себя исследование взаимоотношений между видами или уточнение их систематического положения (Waugh, 2007). Тем не менее метод в некоторых случаях позволяет находить новые виды и приблизительно устанавливать их систематическое родство. Хотя само по себе ДНК-штрихкодирование не может лежать в основе таксономических исследований, оно позволяет идентифицировать предполагаемые новые виды (Decaëns et al., 2013). Например, в работе по фауне дождевых червей Новой Зеландии (Buckley et al., 2011) авторы на основании результатов ДНК-штрихкодирования предположили существование 50 новых видов дождевых червей, что составляет около 1/4 от известной фауны этой группы на данной территории.

Table 1. Earthworm sampling localities

Locality	Number of individuals, <i>n</i>	Number of clusters, Ncl
Podgornoe Village, Chainsk raion, Tomsk oblast	28	5
Novosibirsk, Novosibirsk oblast	56	7
Dubrovka Village, Maslyanino raion, Novosibirsk oblast	27	5
Temirtau Village, Tashtagol raion, Kemerovo oblast	12	2
Makar'evka Village, Solton raion, Altai krai	32	9
Mustag mountain, Tashtagol raion, Kemerovo oblast	4	3
Mukhor-Cherga River, Shebalino raion, Altai Republic	4	1
Artybash Village, Turochak raion, Altai Republic	38	3
Evrechala mountain, Turochak raion, Altai Republic	8	3
Sarlyk mountain, Shebalino raion, Altai Republic	5	2
Tigirek State natural reserve, Kasnoshchekovo raion, Altai krai	31	7
Charyshskoye Village, Charyshskoye raion, Altai krai	14	1

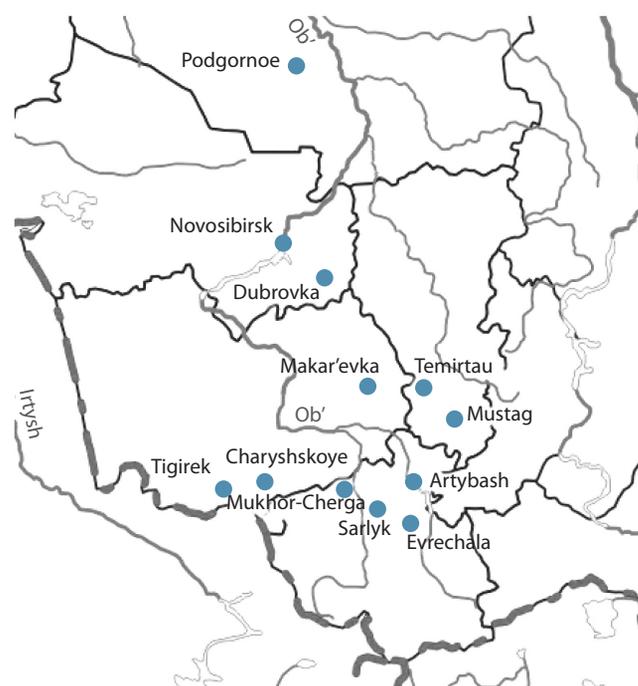
В нашей работе была поставлена задача – изучить генетическое разнообразие дождевых червей на территории юга Западной Сибири при помощи метода ДНК-штрихкодирования. С этой целью была собрана коллекция червей из ряда географических точек и проведено секвенирование фрагмента митохондриального гена *cox1*. Полученные последовательности сравнивали с нашей базой данных надежно определенных видов дождевых червей, а также базами данных GenBank и BOLD.

Материалы и методы

Образцы дождевых червей были собраны в 2011–2015 гг. в различных точках Западной Сибири (табл. 1, рис. 1). Выборки включали как половозрелых, так и ювенильных особей. Для ряда половозрелых животных было проведено морфологическое определение.

ДНК выделяли из нескольких сегментов заднего конца тела при помощи наборов фирмы BioSilica (г. Новосибирск). Для амплификации фрагмента митохондриального гена *cox1* применяли универсальные праймеры: прямой LCO1490m (5'-ТАСТС-ААСАА-АТСАС-АААГА-ТАТТГ-Г-3'), указанный в статье Folmer с коллегами (2014) с модификациями, и обратные HCO2198 (5'-ТАААС-ТТСАС-ГГТГА-ССААА-АААТС-А-3') (Folmer et al., 1994) и COI-E- (5'-ТАТАС-ТТСТГ-ГГТГТ-ССГАА-ГААТС-А-3') (Bely, Wray, 2004). Использовали следующий профиль амплификации: 2 мин при 94 °С; 5 циклов: 20 с при 94 °С; 20 с при 45 °С; 50 с при 72 °С; 33 цикла: 20 с при 94 °С; 20 с при 55 °С; 50 с при 72 °С.

Секвенирование фрагментов гена *cox1* проводили при помощи набора BigDye 3.1 фирмы Applied Biosystems (США). Капиллярный электрофорез был выполнен в Коллективном центре секвенирования СО РАН (г. Новосибирск). Ручная обработка полученных последовательностей была проведена в программе Chromas. Для построения филогенетических деревьев применяли программу Mega v. 5.0 (Tamura et al., 2011). Поиск родственных по-

**Fig. 1.** Sampling sites.

следовательностей проводился в базах данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и BOLD (www.boldsystems.org). Для построения деревьев методом минимальной эволюции использовали модель замен Kimura-2-parameter. Генетические дистанции для анализа *K/θ* были вычислены при помощи программы Mega v. 5.0 (Tamura et al., 2011).

В данной работе объединены результаты ДНК-штрихкодирования 259 образцов дождевых червей из 12 точек юга Западной Сибири. В качестве источника референсных

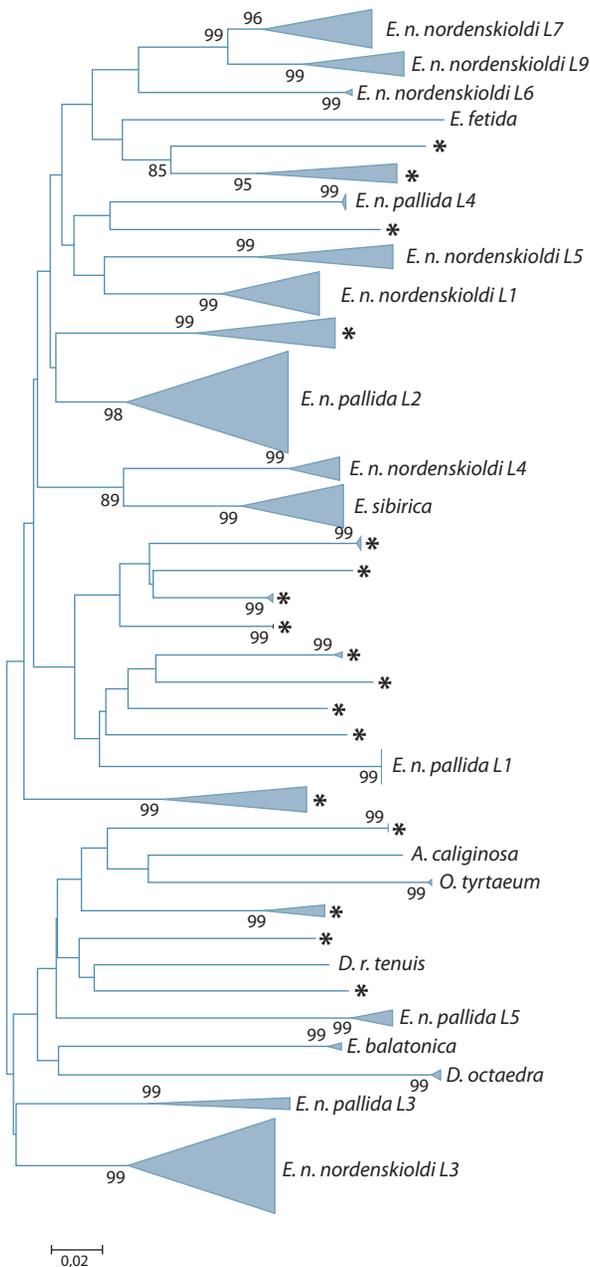


Fig. 2. Phylogenetic tree of *cox1* sequences constructed with the Minimum Evolution algorithm. Numerals above branches indicate the bootstrap support. Clusters are indicated with triangles whose the bases are to the corresponding numbers of sequences and heights, to nucleotide diversity within the clusters. Newly detected clusters are indicated with asterisks. For *E. n. nordenskioldi* and *E. n. pallida*, numbers of genetic strains are shown.

последовательностей использованы базы данных GenBank и BOLD, а также надежно определенные образцы некоторых видов дождевых червей с территории России (*E. n. nordenskioldi*, *E. n. pallida*, *E. sibirica*, *E. balatonica*, *E. fetida*, *D. r. tenuis*, *D. r. subrubicundus*, *O. tyrtaeum*, *D. octaedra*, *A. caliginosa*, *A. trapezoides*, *A. rosea*, *L. rubellus*) (Shekhovtsov et al., 2013, 2014a, b, 2015).

Результаты и обсуждение

Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 2. Известно, что на деревьях, построенных по последовательностям митохондриальной ДНК, как правило, не выделяются ветви, соответствующие таксонам надвидового ранга (Pop et al., 2007; Chang, James, 2011; James, Davidson, 2012), что обусловлено высокой скоростью эволюции последовательностей митохондриальной ДНК у дождевых червей. Многие роды и даже семейства на таких деревьях оказываются полифилетичными. По этой причине принято считать, что митохондриальная ДНК полезна для выявления новых видов дождевых червей, но непригодна для исследования филогенетических взаимоотношений в группе.

В связи с этим кластеризацию проводили следующим образом: кластером, соответствующим одной операционной таксономической единице (Operational Taxonomic Unit, OTU), считали ветвь с бутстрепной поддержкой не менее 95, которая не объединяется с какой-либо другой ветвью на дереве с бутстрепной поддержкой более 90. Исключение было сделано для генетических линий *E. n. nordenskioldi* 7 и 9, а также *E. n. nordenskioldi* линии 4 и *E. sibirica* (см. рис. 2), ареалы которых заметно отличаются, что дает основание предполагать значительные биологические различия.

В выборке обнаружено 27 кластеров. Семь из них относились к известным видам (*A. caliginosa*, *E. fetida*, *E. balatonica*, *E. sibirica*, *O. tyrtaeum*, *D. r. tenuis*, *D. octaedra*). Три известных в Западной Сибири вида-космополита (*E. tetraedra*, *D. r. subrubicundus*, *A. parva*) мы не нашли, скорее всего, в связи с тем, что характерные для них биотопы не были обследованы. Также не удалось обнаружить ни одного достоверно определенного алтайского эндемика. Три кластера соответствовали генетическим линиям *E. n. nordenskioldi*, характерным для данного региона (Shekhovtsov et al., 2013). Оставшиеся 17 из 27 кластеров не имели близкого сходства ни с одной из ранее изученных последовательностей ДНК дождевых червей (табл. 2).

Одним из методов анализа валидности выделения видов на основании последовательностей ДНК является метод K/θ , или «правило 4» ($4 \times$ rule) (Birky et al., 2010). Изначально он был разработан для организмов с бесполом размножением, однако может применяться и в тех случаях, когда изучаемые популяции изолированы и не могут обмениваться генами (что, очевидно, можно допустить для дождевых червей с их слабой способностью к миграциям). Этот подход был использован, например, при анализе комплекса видов *A. caliginosa* (Fernández et al., 2012). Автор метода K/θ показал, что генетические кластеры можно с 95 %-й вероятностью считать разными видами в том случае, если они дивергировали $4 \times Ne$ поколения назад, где Ne – эффективная численность популяций. Оценить этот параметр можно, вычислив отношение K/θ , где K – генетическое расстояние между кластерами, а θ – внутри кластеров. Таким образом, для того, чтобы считать кластеры разными видами, отношение K/θ должно быть больше 4.

По данным нашего анализа, правило это выполнялось для 20 из 26 впервые обнаруженных кластеров. Исключениями были линии 2 и 3 в пределах подвида *E. n. pallida*,

линии 1, 5 и 9 *E. n. nordenskioldi*, а также один из впервые обнаруженных кластеров (Тигирек + Чарышское + Сарлык). Очевидно, что отношение K/θ зависит от степени выявленной генетической изменчивости внутри кластера. Birku с коллегами отмечали, что оценка проводится на основании небольшой выборки из очень больших популяций (Birku et al., 2010). В нашем случае было изучено несколько популяций, находящихся на большом расстоянии друг от друга. Следствием этого было разделение кластеров на несколько ветвей, для которых правило $K/\theta > 4$ выполнялось. Так, кластер Тигирек + Чарышское + Сарлык разделился на два: Тигирек + Чарышское и Сарлык. Линии *E. n. pallida* и *E. n. nordenskioldi* также разделились на несколько субкластеров. Таким образом, использование метода K/θ приводит к увеличению количества выделяемых генетических кластеров.

Черви, относящиеся к 9 из 17 кластеров, были морфологически сходны с группой *E. n. nordenskioldi* / *E. n. pallida*. По нашим данным, на территории России обитают девять генетических линий *E. n. nordenskioldi* (четыре из них в регионе, охватываемом данной работой) и пять линий *E. n. pallida* (лишь одна из них обнаружена в Западной Сибири). Эти линии имеют различия как по митохондриальной, так и по ядерной ДНК, для них характерны значительно различающиеся ареалы. Принимая во внимание высокую генетическую изменчивость комплекса *E. nordenskioldi* (Shekhovtsov et al., 2013), можно предположить, что некоторые из обнаруженных кластеров могут представлять собой новые линии этого комплекса видов.

Можно ли считать, что выявленные кластеры соответствуют видам дождевых червей? По данным анализа Nebert с коллегами (2003), для кольчатых червей характерен более высокий уровень дивергенции последовательной мтДНК между видами одного рода по сравнению с другими животными. Для 70 % родов характерна дивергенция последовательностей *cox1* разных видов свыше 16 %. По данным тех же авторов, степень внутривидовой изменчивости редко превышает 2 %. Однако уровни попарной дивергенции между генетическими линиями *E. nordenskioldi* составляют от 16 до 29 %. Генетическая изменчивость внутри линий этого вида, для которых имеются данные по достаточному количеству популяций, превышает 5 % и доходит у линии 2 *E. n. pallida* до 8,6 %. Таким образом, если судить по степени изменчивости мтДНК, то обнаруженные нами кластеры уверенно можно считать отдельными видами.

Между тем представители значительно различающихся митохондриальных генетических линий одного вида могут в некоторых случаях не иметь существенных различий по ядерным маркерам, что показано, например, для *L. rubellus* (Giska et al., 2015), а также, по нашим данным, для линий 2 и 3 *E. n. pallida*. Таким образом, существование предполагаемого нового вида дождевых червей необходимо подтверждать и при помощи ядерных маркеров.

Хотя метод ДНК-штрихкодирования не может дать окончательный ответ на то, сколько же всего видов дождевых червей обитает на юге Западной Сибири, полученные данные показывают, что видовое разнообразие дождевых червей юга Западной Сибири может быть

Table 2. New *cox1* clusters detected in this study

<i>n</i>	Sampling locality
1	Artybash
5	Artybash
11	Artybash, Makar'evka, Evrechala
2	Makar'evka
2	Makar'evka
2	Makar'evka
4	Tigirek, Makar'evka
4	Tigirek
1	Tigirek
1	Tigirek
1	Tigirek
12	Tigirek, Sarlyk, Charyshskoye
3	Tigirek, Mukhor-Cherga
1	Evrechala
1	Mustag
1	Mustag
1	Mustag

n, number of individuals with the *cox1* haplotype belonging to the corresponding cluster.

значимо выше, чем принято считать на основании данных традиционного морфологического анализа. Даже весьма ограниченная выборка из небольшого числа географических точек позволила уверенно выявить 17 новых генетических кластеров дождевых червей. Они, по-видимому, соответствуют новым таксонам, что позволяет удвоить ранее известное число видов с данной территории (с 16 до 33). Проведенная работа подтверждает представления о высокой криптической изменчивости дождевых червей и свидетельствует о перспективности дальнейших исследований в этом направлении.

Acknowledgments

The authors are grateful to Tamara Semenovna Vsevolodova-Perel' for identifying some specimens of our earthworm collection.

This work was supported by Budgeted Project VI.58.1.3; State contract 6.1957.2014/K, and President of the Russian Federation, project MK 6685.2015.4.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bely A.E., Wray G.A. Molecular phylogeny of nauidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004;30:50-63. DOI 10.1016/S1055-7903(03)00180-5

- Birky C.W. Jr., Adams J., Gemmel M., Perry J. Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. *PLoS One*. 2010;5(5):10609. DOI 10.1371/journal.pone.0010609
- Bienert F., De Danieli S., Miquel C., Coissac E., Poillot C., Brun J.-J. Tracking earthworm communities from soil DNA. *Mol. Ecol.* 2012; 21(8):2017-2030. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05407.x
- Buckley T.R., James S., Allwood J., Bartlam S., Howitt R., Prada D. Phylogenetic analysis of New Zealand earthworms (Oligochaeta: Megascolecidae) reveals ancient clades and cryptic taxonomic diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2011;58:e85-96. DOI 10.1016/j.ympev.2010.09.024
- Chang C.-H., James S. A critique of earthworm molecular phylogenetics. *Pedobiologia*. 2011;54:S3-S9. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.07.015
- Decaëns T., Porco D., Rougerie R., Brown G.G., James S.W. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Appl. Soil Ecol.* 2013;65:35-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.001>
- Fernández R., Almodóvar A., Novo M., Simancas B., Díaz Cosin D.J. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012;64(2):368-379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.04.011>
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Marine Biol. Biotech.* 1994;3:294-299.
- Giska I., Sechi P., Babik W. Deeply divergent sympatric mitochondrial lineages of the earthworm *Lumbricus rubellus* are not reproductively isolated. *BMC Evol. Biol.* 2015;15:217. DOI 10.1186/s12862-015-0488-9
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. 2003;270:96-99. DOI 10.1098/rsbl.2003.0025
- Hendrix P.F., Callahan M.A., Drake J.M., Huang C.-Y., James S.W., Snyder B.A., Zhang W. Pandora's box contained bait: the global problem of introduced earthworms. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Systematics*. 2008;39:593-613. DOI 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173426
- James S.W., Davidson S.K. Molecular phylogeny of earthworms (Annelida: Crassielitellata) based on 28S, 18S and 16S gene sequences. *Invertebrate Systematics*. 2012;26:213-229. <http://dx.doi.org/10.1071/IS11012>
- King R.A., Tibble A.L., Symondson W.O.C. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Mol. Ecol.* 2008;17(21):4684-4698. DOI 10.1111/j.1365-294X.2008.03931.x
- Pérez-Losada M., Bloch R., Breinholt J.W., Pfenninger M., Domínguez J. Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. *Eur. J. Soil Biol.* 2012;48:41-47. DOI 10.1016/j.ejsobi.2011.10.003
- Pop A.A., Cech G., Wink M., Csuzdi C., Pop V.V. Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *Eur. J. Soil Biol.* 2007;43:S43-S52. DOI 10.1016/j.ejsobi.2007.08.007
- Porco D., Decaens T., Deharveng L., James S.W., Skarzynski D., Erseus C., Butt K.R., Richard B., Hebert P.D.N. Biological invasions in soil: DNA barcoding as a monitoring tool in a multiple taxa survey targeting European earthworms and springtails in North America. *Biol. Invasions*. 2013;15:899-910. DOI 10.1007/s10530-012-0338-2
- Richard B., Decaens T., Rougerie R., James S.W., Porco D., Hebert P.D.N. Re-integrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding. *Mol. Ecol. Res.* 2010;10(4):606-614. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02822.x
- Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Peltek S.E. Phylogeography of the Earthworm *Eisenia nordenskioldi* sub sp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Oligochaeta) in Northeastern Eurasia. *Doklady Biological Sciences*. 2015;461:1-4. DOI 10.1134/S0012496615020039
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Cryptic diversity within the Nordenskiöld's earthworm, *Eisenia nordenskioldi* subsp. *nordenskioldi* (Lumbricidae, Annelida). *Eur. J. Soil Biol.* 2013;58:13-18. DOI 10.1016/j.ejsobi.2013.05.004
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Genetic diversity of the earthworm *Octolasion tyraeum* (Lumbricidae, Annelida). *Pedobiologia*. 2014a;57:245-250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.09.002>
- Shekhovtsov S.V., Golovanova E.V., Peltek S.E. Invasive lumbricid earthworms of Kamchatka (Oligochaeta). *Zoological Studies*. 2014b;53:52. DOI 10.1186/s40555-014-0052-0
- Striganova B.R., Porjadina N.M. Zhivotnoe naselenie pochv boreal'nykh lesov Zapadno-Sibirskoy ravniny [Soil Animal Population in Boreal Forests of West-Siberian Plain]. Moscow, KMK Scientific Press Ltd., 2005.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011;28:2731-2739. DOI 10.1093/molbev/msr121
- Vsevolodova-Perel T.S. Dozhdevye chervi Rossii: kadastr i opredelitel [The Earthworms of the Fauna of Russia: Kadaster and Key]. Moscow, Nauka, 1997.
- Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*. 2007;29:188-197. DOI 10.1002/bies.20529

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева

Подписано в печать 20.02.2016 г. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 15,1. Уч.-изд. л. 21,2

Тираж 200 экз. Заказ № 33

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090