

Том 60, Номер 11

ISSN 0016-6758

Ноябрь 2024



# ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 60, номер 11, 2024

---

## Обзорные и теоретические статьи

Генетические варианты, вызывающие тератозооспермию у человека

*М. А. Клещев, А. В. Осадчук, Л. В. Осадчук*

3

---

## Молекулярная генетика

Молекулярная эволюция и дифференциальная экспрессия  
мобильных элементов *TLEWI* вида *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

*М. В. Пузаков, Л. В. Пузакова, Ю. Н. Улупова*

21

---

## Генетика растений

Генетическое разнообразие, структура и дифференциация видового комплекса  
*Picea abies*–*Picea obovata*–*Picea koraiensis* по данным микросателлитного анализа  
хлоропластной ДНК

*А. Я. Ларионова, С. А. Семерикова, А. К. Экарт, А. Н. Кравченко,*

*В. Л. Семериков, М. А. Полежаева*

35

---

## Генетика животных

Изучение митохондриальных геномов крупного рогатого скота из археологических находок  
на территории Ярославля (XIII–XIV вв.)

*А. С. Абдельманова, М. С. Форнара, Н. Ф. Бакоев, Е. Е. Антипина,*

*Л. В. Яворская, А. В. Доцев, Н. А. Зиновьева*

50

---

## Генетика человека

Динамика популяционной структуры населения Белгородской области. Национальный состав

*К. Н. Сергеева, С. Н. Соколов, Ю. И. Гончарова, И. В. Батлуцкая, И. Н. Сорокина*

60

Таргетное секвенирование гена *LEP* в различных этнических группах подростков с ожирением

*Е. В. Беляева, Т. А. Баирова, О. А. Еришова, А. Ю. Самбялова, В. В. Синьков,*

*В. В. Бальжиева, Л. В. Рычкова, Л. И. Колесникова*

77

Анализ структуры митохондриального генофонда русских старожилов  
арктического побережья Якутии из с. Русское Устье

*Т. В. Борисова, А. В. Соловьев, Г. П. Романов, Ф. М. Терютин,*

*В. Г. Пшеничкова, Н. А. Барашков, С. А. Федорова*

86

Экспрессия микроРНК miR-29a, miR-30c И miR-150 в отдаленные сроки  
после хронического радиационного воздействия

*М. А. Янишевская, Е. А. Блинова, А. В. Аклев*

97

---

### Краткие сообщения

Экспрессия генов *LYST* и *SLFN12L* в лейкоцитах периферической крови у больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания

*И. Е. Мальшева, О. В. Балан, Э. Л. Тихонович*

107

Геномный анализ окраса меха соболя (*Martes zibellina* L.), поиск мутаций, определяющих отсутствие пигментации (альбинос)

*П. А. Филимонов, А. Д. Манахов, М. И. Митина, А. А. Онохов, И. Е. Чернова, Л. В. Максимова, С. Н. Каштанов, Е. И. Рогов*

112

Персоналии

118

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ТЕРАТОЗООСПЕРМИЮ У ЧЕЛОВЕКА<sup>1</sup>

© 2024 г. М. А. Клещев<sup>1</sup>, \* , А. В. Осадчук<sup>1</sup>, Л. В. Осадчук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск 630090 Россия

\*e-mail: max82c11@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.01.2024 г.

После доработки 14.05.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Известно, что патогенные варианты генов, контролирующих спермиогенез, могут приводить к проявлению мономорфной тератозооспермии, которая характеризуется преобладанием морфологических аномалий какого-либо одного типа – глобозооспермии, макрозооспермии, ацефалии сперматозоидов, множественных аномалий жгутика сперматозоидов, а также полиморфной тератозооспермии, при которой в эякуляте встречаются несколько типов аномалий сперматозоидов. Сведения, полученные в результате систематизации и анализа информации о патогенных вариантах генов, связанных с нарушением морфологии сперматозоидов, могут быть полезны для понимания молекулярно-генетических механизмов развития тератозооспермии. В результате анализа литературных источников и сведений, содержащихся в базах данных Malacards, OMIM, KEGG, CTD, DisGeNET, собрана и систематизирована информация о 109 генах человека, патогенные варианты которых связаны с развитием тератозооспермии определенного типа: глобозооспермии, синдрома множественных аномалий жгутика, дисплазии фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов, ацефалии, макрозооспермии, полиморфной тератозооспермии. При этом каждый тип тератозооспермии обусловлен нарушением специфических биологических процессов, и патогенные варианты генов, контролирующие процессы, связанные с организацией и функционированием цитоскелета и внутриклеточным транспортом, вносят наибольший вклад в формирование генетически обусловленной тератозооспермии.

*Ключевые слова:* спермиогенез, морфология сперматозоидов, бесплодие, тератозооспермия, морфологические дефекты сперматозоидов.

DOI: 10.31857/S0016675824110015 EDN: WBTWNX

Бесплодие является достаточно распространенным заболеванием, от которого страдают 8–12% пар, при этом примерно в половине случаев бесплодие обусловлено либо только мужским фактором, либо дисфункцией репродуктивной системы как мужчины, так и женщины [1]. Известно, что потенциальная фертильность мужчины во многом определяется качеством его эякулята. Наиболее часто при диагностике мужского бесплодия оцениваются количество и концентрация сперматозоидов в эякуляте, доля подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов [2]. Однако для человека, в отличие от других видов животных, характерен значительный полиморфизм сперматозоидов. Известно, что эякулят даже здорового мужчины,

помимо сперматозоидов, которые рассматриваются как морфологически нормальные, содержит значительное число сперматозоидов с различными нарушениями морфологии головки, средней части и жгутика. К морфологическим дефектам сперматозоидов относятся аморфные головки, грушевидные головки, аномалии акросомы, утолщение средней части, закрученный жгутик и другие аномалии. В настоящее время имеется несколько классификационных систем морфологии сперматозоидов человека, в которых описаны морфологические признаки нормальных сперматозоидов, а также определены различные типы морфологических дефектов половых клеток [2, 3]. Исследования сперматозоидов, собранных с поверхности *zona pellucida* яйцеклетки, преодолевших цервикальный барьер, позволили определить критерии для сперматозоидов, рассматриваемых как морфологически нормальные, которые описаны в «Руководстве

<sup>1</sup>Дополнительные материалы размещены в электронном виде по doi статьи.



ВОЗ по исследованию эякулята...» [2]. Согласно этому руководству, доля нормальных сперматозоидов ниже 4% рассматривается как тератозооспермия. Различают неспецифическую (полиморфную) и специфическую (мономорфную) тератозооспермию. В первом случае в образце эякулята встречается несколько типов морфологических аномалий сперматозоидов в различных соотношениях. Во втором случае в эякуляте представлен только какой-либо один тип морфологических аномалий сперматозоидов, либо представлено определенное сочетание аномалий разных типов [4, 5]. Считается, что неспецифическая тератозооспермия, которая отмечается в подавляющем большинстве случаев, обусловлена нарушением функционирования сперматогенного эпителия и семьявносящих путей в результате воздействия негативных факторов окружающей среды и образа жизни, а также различных андрологических заболеваний [6]. Однако полиморфная тератозооспермия может иметь и генетическое происхождение. Например, патогенные варианты в генах *FBXO43* [7], *PNLDC1* [8] сопровождаются 100%-ным присутствием в эякуляте аномальных сперматозоидов нескольких типов, включая аморфные, круглые, удлинённые, маленькие головки, короткие жгутики сперматозоидов.

Специфическая тератозооспермия встречается довольно редко (< 1% всех случаев тератозооспермии), и ее причиной являются патогенные варианты определенных генов, контролирующих сперматогенез [9]. К мономорфной тератозооспермии относится глобозооспермия (головки сперматозоидов округлой формы, без акросомы), макрозооспермия (головки сперматозоидов большого размера, часто с множественными жгутиками), множественные аномалии жгутика сперматозоидов (многочисленные сочетанные аномалии жгутика, включающие короткие, закрученные жгутики нерегулярной толщины), дисплазия фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов, ацефалия сперматозоидов.

Считается, что тератозооспермия является одной из главных причин мужского бесплодия, поскольку морфологически аномальные сперматозоиды не способны преодолеть естественный цервикальный барьер и достигнуть места оплодотворения. Кроме того, в ряде исследований показано, что увеличение встречаемости морфологически аномальных сперматозоидов ассоциировано с увеличением фрагментации ДНК половых клеток [10, 11], уровня оксидативного стресса [12], частоты анеуплоидии. Эти нарушения также могут вносить вклад в снижение оплодотворяющей способности сперматозоидов у пациентов с тератозооспермией, которое может наблюдаться как *in vivo*, так и при применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [13]. Влияние нарушения морфологии сперматозоидов на фертильность

обуславливает необходимость тщательного исследования молекулярно-генетических и физиологических механизмов развития тератозооспермии, ее этиологических факторов. Известно, что морфологические аномалии сперматозоидов возникают главным образом в результате нарушений процесса спермиогенеза и в гораздо более редких случаях нарушения созревания сперматозоидов в эпидидимисах, которые возникают из-за патогенных генетических вариантов или влияния средовых факторов. Спермиогенез – сложный многоступенчатый процесс дифференцировки сперматиды, изначально имеющей морфологию типичной эукариотической клетки, в дифференцированный сперматозоид, имеющий видоспецифичную форму. Процесс спермиогенеза включает четыре фазы – фазу Гольджи, фазу шапочки, фазу акросомы и фазу созревания [14]. В *фазе Гольджи* везикулы, которые отпочковываются от аппарата Гольджи, мигрируют к ядру и сливаются, образуя акросомальный пузырек. Он в свою очередь прикрепляется к ядру с помощью пластинки, образованной нитями актина, кератина 5 и миозина Va, которая называется акроплаксомой. Точное позиционирование и прикрепление проакросомальных везикул обеспечивается целым рядом белков, включая белки Smar2, PICK1, Dpy19l2 и SUN5 [15]. Формирование аксонемы также начинается в фазе Гольджи с причаливания центросомы к ядерной мембране на стороне ядра, противоположной от акросомы, после чего происходит сборка микротрубочек аксонемы [16]. На *стадии шапочки* акросомный пузырек уплощается и охватывает переднюю часть ядра сперматиды. Ключевую роль в этом процессе играют белки ACRBP-V5 и Hrb [15]. Нити кератина 5 и ряд дополнительных белков образуют кольцо (marginal ring), расположенное на каудальном крае акроплаксомы, которое соединяет акросому с ядерной мембраной [38]. Процесс распространения акросомального пузырька по поверхности ядра опосредуется акроплаксомой благодаря нитям F-актина [17]. На *стадии акросомы* начинается удлинение ядра и формирование видоспецифичной формы головки. В начале этой фазы формируется манжета – временная структура, которая появляется, когда ядро начинает удлиняться, и разрушается, когда завершаются формирование ядра и конденсация хроматина. Манжета состоит из перинуклеарного кольца, а также интеркалирующих нитей актина и микротрубочек, состоящих из альфа- и бета-тубулина. Внешне манжета напоминает юбочку, которая охватывает ядро. Функция манжеты заключается в транспорте разнообразных белков по направлению к развивающемуся жгутику по нитям тубулина с помощью моторных белков, что имеет важнейшее значение для формирования жгутика и конденсации ядра. Кроме того, манжета участвует в создании видоспецифичной формы ядра,

поскольку во время удлинения ядра кольцо акроплаксомы (marginal ring) и перинуклеарное кольцо манжеты постепенно уменьшают свой диаметр и движутся по направлению к жгутику сперматиды по поверхности ядра, оказывая на него давление, что способствует изменению формы [17, 18].

Наконец, на *стадии созревания* происходит завершение удлинения сперматиды, и большая часть цитоплазмы и органелл сперматиды удаляется, формируя резидуальные тельца, которые затем фагоцитируются клетками Сертоли [14]. На стадии созревания также происходит конденсация хроматина, которая начинается в конце фазы акросомы [16]. В ходе конденсации хроматина происходит замещение гистонов сначала на транзиторные белки, а затем на протамины (PRM1 и PRM2). Конденсация хроматина необходима для защиты ДНК сперматозоида при его транспорте через семявыносящие пути и прохождении через половые пути самки, кроме того, корректное прохождение процесса конденсации хроматина необходимо для формирования сперматозоидов с нормальной формой головки. Следует отметить, что большое значение для формирования нормальной формы ядра будущего сперматозоида имеют клетки Сертоли, которые охватывают верхнюю треть ядра сперматиды, оказывая координированное давление на нее. Специализированные, характерные только для клеток Сертоли, якорные межклеточные контакты, называемые apical ectoplasmic specialization (aES) [19], — это богатые актиновыми филаментами, а также специализированными белками структуры, формирующиеся между ЭПР клеток Сертоли и плазматической мембраной сперматид. Эти структуры наряду с тубуло-бульбарным комплексом заякоривают развивающиеся сперматиды в углублениях, образуемых цитоплазматическими выростами клеток Сертоли, обеспечивая корректную ориентацию сперматид в пространстве [14]. Кроме того, предполагается, что нити F-актина образуют «обручи» в цитоплазме цитоплазматических выростов клеток Сертоли, которые могут оказывать давление на ядро сперматиды [17] посредством быстрой полимеризации и деполимеризации актиновых волокон при участии белкового комплекса Arp2/3 и Ferкиназы [16]. В то же время перинуклеарная тека и акроплакса при участии специализированных белков, в частности SubH2B, RAB2A [15], ACTL9 [20], ACTL7A [21], уравнивают внешнее давление цитоплазматических выростов клеток Сертоли, способствуя образованию видоспецифичной формы ядра [15].

В настоящее время известно более 2000 генов, контролирующих сперматогенез [5]. Патогенные генетические варианты и аномальная экспрессия некоторых из них могут лежать в основе наследственно обусловленной тератозооспермии [22]. Информация об этих генах необходима для

выяснения причин тератозооспермии, оценки рисков при проведении ВРТ, а также для понимания механизмов спермиогенеза. В настоящее время уделяется значительное внимание исследованию генетических вариантов, обуславливающих появление мономорфной тератозооспермии у человека, чему способствуют развитие и широкое использование методов полноэкзомного секвенирования. Кроме того, для многих морфологических синдромов созданы «мышинные модели», основанные на нокауте целевых генов-кандидатов [23]. К настоящему времени получен значительный объем данных о молекулярно-генетических механизмах развития глобозооспермии [24], макрозооспермии [19], ацефалии сперматозоидов [25], множественных аномалий жгутика сперматозоидов [26].

Цель настоящей работы — обобщение и анализ современных данных о генетических вариантах, вызывающих тератозооспермию у человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Поиск информации в научной литературе*

Информация о генах, ассоциированных с проявлением различных форм тератозооспермии у человека, извлекалась из экспериментальных и обзорных статей, индексированных в PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) по состоянию на сентябрь 2023 г. При поиске информации использовали поисковые запросы, описывающие тератозооспермию в целом (teratozoospermia, abnormal sperm morphology) и различные формы мономорфной тератозооспермии, такие как глобозооспермия (globozoospermia), множественные аномалии жгутика сперматозоидов (MMAF sperm, multiple morphological abnormalities of the sperm flagella), ацефалия сперматозоидов (acephalic spermatozoa syndrome) макрозооспермия (macrozoospermia), дисплазия фиброзной оболочки (dysplasia of the fibrous sheath sperm). Кроме того, информация о генах, связанных с проявлением тератозооспермии, извлекалась из баз данных Malacards (<https://www.malacards.org/>) [27], OMIM (<https://www.omim.org/>), KEGG (<https://www.kegg.jp/>), CTD (<http://ctdbase.org/>) [28], DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), в которых содержатся сведения об ассоциации вариантов в определенных генах с различными заболеваниями человека. Поиск в базах данных проводился по ключевым словам teratozoospermia, abnormal sperm morphology. Кроме того, информация о генах, связанных с тератозооспермией, была получена с использованием программы ANDVisio [29]. Сведения об ассоциации каждого гена с тератозооспермией, полученные из баз данных, указанных выше, проверялись путем поиска публикаций в PubMed с использованием следующего поискового запроса: («teratozoospermia» OR «abnormal

sperm morphology») AND («официальный символ гена согласно базе данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>» OR «символ гена указанный в соответствующей БД») либо по ссылкам в самой базе данных. В настоящую статью включены только те гены, для которых найдены публикации, описывающие взаимосвязь соответствующего гена с фенотипическим проявлением тератозооспермии у человека.

#### Анализ данных

Информация о генах, извлеченная из литературных источников, заносилась в специальную таблицу в файле MS Excel (табл. 1 Приложения). Указанная таблица содержит следующую информацию: идентификационный номер, официальный символ, полное название гена согласно базе данных NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), обозначение одного или нескольких патогенных генетических вариантов, вызывающих тератозооспермию, приведенное в соответствующей статье, тип тератозооспермии, PMID публикации, из которой была получена информация. В таблице приведены следующие типы тератозооспермии: ацефалия сперматозоидов, глобозоспермия, множественные аномалии жгутика сперматозоидов, дисплазия фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов, макрозооспермия, полиморфная тератозооспермия, преобладание удлинённых головок сперматозоидов, преобладание грушевидных головок сперматозоидов, разрушение митохондриальной оболочки. Если в статье не приведены сведения о преобладающих типах морфологических аномалий сперматозоидов, то в поле «Тип тератозооспермии» содержится обозначение «Нет данных». Номенклатура генетических вариантов приведена в соответствии с правилами Sequence Variant Nomenclature (<https://varnomen.hgvs.org/>).

#### Функциональная аннотация генов

Функциональная аннотация набора генов, представленных в табл. 1 Приложения, была проведена с использованием интернет-ресурса Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID версия 2021 <https://david.ncifcrf.gov/>). Данный ресурс позволяет получить списки генов, аннотированных для каждого термина геной онтологии, и выявить термины, наиболее тесно ассоциированные с исследуемым набором генов. FDR (false discovery rate) = 0,05 для каждого термина использовался в качестве порогового значения, характеризующего статистическую значимость превышения (обогащения) наблюдаемого числа ассоциаций исследуемых генов с этим термином по сравнению с ожидаемым числом ассоциаций.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ТЕРАТОЗООСПЕРМИЕЙ У ЧЕЛОВЕКА

Анализ литературных источников, индексированных в PubMed, позволил получить информацию о 109 генах, 263 патогенных варианта которых вызывают тератозооспермию у человека. Информация об этих патогенных генетических вариантах приведена в табл. 1 Приложения. При этом патогенные варианты 41 гена вызывают синдром множественных аномалий жгутика сперматозоидов, 16 генов – дисплазию фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов, 14 генов – глобозоспермию, патогенные варианты в девяти генах приводили к ацефалии сперматозоидов. Полиморфная тератозооспермия оказалась связана с полиморфизмами в 25 генах. Списки этих генов приведены в табл. 1. Кроме того, патогенные генетические варианты некоторых генов вызывали макрозооспермию (2 гена – *AURKC* и *ZMYND15*) и нарушение ультраструктуры митохондриальной оболочки (*MIAP*), преобладание в образцах эякулята испытуемых удлинённых (*WDR12* и *SLC26A8*) и грушевидных головок сперматозоидов (*CC2D1B*).

Перечисленные выше гены регулируют множество биологических процессов, которые так или иначе вовлечены в спермиогенез. Чтобы обобщить эту информацию, можно провести функциональную аннотацию полученного набора генов, т.е. получить список терминов геной онтологии, которые статистически значимо связаны с исследуемым набором генов, что позволяет понять, какие биологические процессы регулируют изучаемые гены и в каких клеточных структурах эти процессы локализованы. Результаты функциональной аннотации приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, общими для генов, отвечающих за формирование всех типов тератозооспермии, являются термины, описывающие процесс сперматогенеза, такие как *male gamete generation* (GO:0048232), *spermatogenesis* (GO:0007283), *gamete generation* (GO:0007276). Однако термины, описывающие процессы, отвечающие за сборку (*cilium assembly*, *axoneme assembly*, *axonemal dynein complex assembly*) ресничек и жгутиков, обеспечение их подвижности (*flagellated sperm motility*, *sperm motility*, *cilium-dependent cell motility*, *cilium movement*), организацию микротрубочек (*microtubule cytoskeleton organization*) и внутриклеточный транспорт (*microtubule-based protein transport*, *protein transport along microtubule*), являются специфичными для набора генов, связанных с проявлением множественных аномалий жгутика сперматозоидов и дисплазии фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов. Только с данными синдромами связаны процессы, локализованные в структурах цитоскелета жгутиков (*polymeric cytoskeletal fiber*, *axonemal dynein complex*, *microtubule cytoskeleton*, *inner dynein arm*, *outer*



**Таблица 1.** Список генов, патогенные варианты которых вызывают некоторые формы тератозооспермии

Тип тератозооспермии	Описание	Список генов
Глобозооспермия	70–100% сперматозоидов имеют круглые головки без акросомы	<i>CCNB3, CHPT1, SPACA1, CCDC62, C2CD6, GGN, SPACDR, PICK1, AGFG1, DPY19L2, TEKT3, PIWIL4, ZPBP, SPATA16</i>
Множественные аномалии жгутика сперматозоидов	70–100% сперматозоидов имеют многочисленные сочетанные аномалии жгутика, включающие короткие, закрученные жгутики нерегулярной толщины	<i>AKAP4, CEP135, QRICH2, ARMC2, CFAP65, CFAP91, CFAP251, CFAP43, CFAP44, CFAP69, AK7, FSIP2, TTC21A, DNAH17, SPEF2, DZIP1, DNAH10, IFT74, BRWD1, CFAP61, CFAP70, CFAP47, DNAH8, CFAP58, CCDC34, DNALI1, CFAP74, CCDC39, DNAH2, DNAH1, SPAG6, TTC29, DNHD1, WDR19</i>
Дисплазия фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов	100% сперматозоидов характеризуются короткими жгутиками нерегулярной толщины	<i>QRICH2, CFAP43, CFAP44, CFAP58, DNAH2, DNAH1, AKAP4, SPPL2C, TPTE2, MDC1, DNAH6, DRC1, ATP2B4, CEP350, CEP290, GAPDHS</i>
Синдром ацефалии сперматозоидов	У 90–100% сперматозоидов головка отделена от жгутика	<i>SPATC1L, SPATA20, TSGA10, CEP112, PMFBP1, HOOK1, BRDT, SUN5</i>
Полиморфная тератозооспермия	96–100% сперматозоидов имеют морфологические аномалии нескольких типов – аморфные головки, аномалии акросомы, акуализированные головки и т. д.	<i>KIAA1210, IQCN, PNLDC1, GCNA, FBXO43, DNAH6, ZPBP, CATIP, FKBP6, IFT140, KATNAL2, BSCL2, SEPTIN12, SPATA16, CCIN, ACTL9, DRC1, USP26, ACTL7A, PRSS55, SOHLH1, CT55, DNAJB13, KGNU1, SSX1, TAF7L</i>

Примечание. Символы генов приведены с соответствии с NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Жирным шрифтом выделены гены, патогенные варианты которых вызывают развитие тератозооспермии нескольких типов.

*dynein arm, dynein complex*). Термины, характеризующие процессы формирования акросомы (*acrosome assembly*) и секреторных гранул внутри клетки (*secretory granule organization*), а также процесс оплодотворения (*single fertilization, fertilization*), являются специфичными для набора генов, ассоциированных с полиморфной тератозооспермией. Для генетически обусловленной полиморфной тератозооспермии характерными являются процессы, локализованные во внутриклеточных органеллах (*intracellular organelle*) и структурах актинового цитоскелета (*actin cytoskeleton*). Таким образом, проведенная функциональная аннотация генов, патогенные варианты которых вызывают различные формы тератозооспермии, показала, что каждый тип тератозооспермии обусловлен нарушением специфических биологических процессов в ходе сперматогенеза. Однако те или иные термины, описывающие процессы, связанные с организацией и функционированием цитоскелета (*microtubule cytoskeleton organization, microtubule-based protein transport, protein transport along microtubule, secretory granule organization*), являются общими для полиморфной тератозооспермии и синдрома МАЖС.

Кроме того, интересно отметить, что термин, характеризующий формирование акросомы (*acrosome assembly*), оказался значимо связан с набором генов, патогенные варианты в которых вызывают полиморфную тератозооспермию, что свидетельствует о том, что структуры цитоскелета и внутриклеточные процессы, обеспечивающие формирование акросомы, необходимы и для морфогенеза остальных структур сперматозоида.

Далее будут подробно рассмотрены молекулярно-генетические механизмы регуляции некоторых наиболее распространенных типов специфической (мономорфной) тератозооспермии. Следует отметить, что полиморфная тератозооспермия – гетерогенное по своей природе заболевание, причиной которого являются как средовые, так и генетические факторы. Хотя имеется ряд публикаций, в которых описаны патогенные генетические варианты, вызывающие полиморфную тератозооспермию, следует отметить, что молекулярно-генетические механизмы формирования полиморфной тератозооспермии изучены значительно хуже, чем мономорфной тератозооспермии. Подробное рассмотрение генетических вариантов, вызыва-

Таблица 2. Термины геномной онтологии, ассоциированные с набором генов, патогенные варианты которых вызывают тератозооспермию

Термины геномной онтологии	
Тип тератозооспермии	биологические процессы (GOTERM_BP_5)
Глобозооспермия	<p>gamete generation(GO:0007276)  spermatogenesis(GO:0007283)  male gamete generation(GO:0048232)  cell development(GO:0048468)  spermatid development(GO:0007286)  spermatid differentiation(GO:0048515)  germ cell development(GO:0007281)</p>
Ацефалические сперматозоиды	<p>spermatogenesis(GO:0007283)  male gamete generation(GO:0048232)  gamete generation(GO:0007276)</p>
Множественные аномалии жгутика сперматозоидов	<p>cilium organization(GO:0044782)  cilium assembly(GO:0060271)  axoneme assembly(GO:0035082)  flagellated sperm motility(GO:0030317)  sperm motility(GO:0097722)  sperm axoneme assembly(GO:0007288)  microtubule cytoskeleton organization(GO:0000226)  <b>cilium movement(GO:0003341)</b>  spermatid development(GO:0007286)  spermatid differentiation(GO:0048515)  germ cell development(GO:0007281)  spermatogenesis(GO:0007283)  male gamete generation(GO:0048232)  gamete generation(GO:0007276)  cilium-dependent cell motility(GO:0060285)  cilium or flagellum-dependent cell motility(GO:0001539)  axonemal dynein complex assembly(GO:0070286)  epithelial cilium movement(GO:0003351)  cell development(GO:0048468)  <b>intraciliary transport(GO:0042073)</b>  <b>microtubule-based protein transport(GO:0099118)</b>  <b>protein transport along microtubule(GO:0098840)</b></p>
	<p>акросомальная локализация (GOTERM_CC_5)   акросомальная везикула (GO:0001669)</p>
	<p>cytoskeleton(GO:0005856)  motile cilium(GO:0031514)  <b>centrosome(GO:0005813)</b>  <b>microtubule organizing center(GO:0005815)</b>  sperm connecting piece(GO:0097224)  sperm flagellum(GO:0036126)  9+2 motile cilium(GO:0097729)</p>
	<p>motile cilium(GO:0031514)  9+2 motile cilium(GO:0097729)  ciliary part(GO:0044441)  sperm flagellum(GO:0036126)  axoneme(GO:0005930)  ciliary plasm(GO:0097014)  cytoskeleton(GO:0005856)  dynein complex(GO:0030286)  cytoskeletal part(GO:0044430)  axonemal dynein complex(GO:0005858)  microtubule associated complex(GO:0005875)  <b>sperm midpiece(GO:0097225)</b>  axoneme part(GO:0044447)  intracellular non-membrane-bounded organelle(GO:0043232)  microtubule cytoskeleton(GO:0015630)  inner dynein arm(GO:0036156)  <b>outer dynein arm(GO:0036157)</b>  microtubule(GO:0005874)  <b>polymeric cytoskeletal fiber(GO:0099513)</b>  sperm connecting piece(GO:0097224)</p>

Таблица 2. Окончание

<p>Глобозооспермия</p>	<p><i>gamete generation</i>(GO:0007276)  <i>spermatogenesis</i>(GO:0007283)  <i>male gamete generation</i>(GO:0048232)                      cell development(GO:0048468)                      spermatid development(GO:0007286)                      spermatid differentiation(GO:0048515)                      germ cell development(GO:0007281)</p>	<p>acrosomal vesicle (GO:0001669)</p>
<p>Дисплазия фиброзной оболочки жгутилка сперматозоидов</p>	<p>sperm motility(GO:0097722)                      flagellated sperm motility(GO:0030317)                      cilium assembly(GO:0060271)                      axoneme assembly(GO:0035082)                      cilium organization(GO:0044782)                      sperm axoneme assembly(GO:0007288)                      cilium or flagellum-dependent cell motility(GO:0001539)                      cilium-dependent cell motility(GO:0060285)                      microtubule cytoskeleton organization(GO:0000226)                      spermatid development(GO:0007286)                      spermatid differentiation(GO:0048515)                      cilium movement(GO:0003341)  <i>spermatogenesis</i>(GO:0007283)  <i>male gamete generation</i>(GO:0048232)                      germ cell development(GO:0007281)  <i>gamete generation</i>(GO:0007276)                      axonemal dynein complex assembly(GO:0070286)</p>	<p>motile cilium(GO:0031514)                      9+2 motile cilium(GO:0097729)                      ciliary part(GO:0044441)                      sperm flagellum(GO:0036126)                      axoneme(GO:0005930)                      dynein complex(GO:0030286)                      ciliary plasm(GO:0097014)                      cytoskeleton(GO:0005856)                      axonemal dynein complex(GO:0005858)                      microtubule associated complex(GO:0005875)                      cytoskeletal part(GO:0044430)                      microtubule cytoskeleton(GO:0015630)                      intracellular non-membrane-bounded organelle(GO:0043232)                      axoneme part(GO:0044447)                      inner dynein arm(GO:0036156)</p>
<p>Полиморфная тератозооспермия</p>	<p><i>spermatogenesis</i>(GO:0007283)  <i>male gamete generation</i>(GO:0048232)  <i>gamete generation</i>(GO:0007276)                      germ cell development(GO:0007281)                      spermatid development(GO:0007286)                      spermatid differentiation(GO:0048515)  <b>acrosome assembly</b>(GO:0001675)  <b>single fertilization</b>(GO:0007338)  <b>fertilization</b>(GO:0009566)  <b>secretory granule organization</b>(GO:0033363)</p>	<p>acrosomal vesicle(GO:0001669)                      microtubule associated complex(GO:0005875)                      axoneme(GO:0005930)                      ciliary plasm(GO:0097014)                      cytoskeletal part(GO:0044430)                      cytoskeleton(GO:0005856)  <b>intracellular organelle</b>(GO:0043229)                      motile cilium(GO:0031514)  <b>actin cytoskeleton</b>(GO:0015629)</p>

Примечание. Приведены термины генной онтологии, значимо (FDR<0,05) ассоциированные с исследуемым набором генов. Жирным шрифтом выделены термины, специфичные для генов, связанных с возникновением определенного типа тератозооспермии. Курсивом выделены термины, общие для генов, связанных с возникновением всех типов тератозооспермии.

ющих полиморфную тератозооспермию, и механизмов ее формирования выходит за рамки настоящего обзора и будет предметом дальнейших публикаций.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЕ МОНОМОРФНОЙ ТЕРАТОЗООСПЕРМИИ

### *Глобозооспермия*

#### *Описание фенотипа и распространенность*

Глобозооспермия является формой тератозооспермии, при которой в эякуляте обнаруживаются сперматозоиды, не имеющие акросомы, с головками округлой формы, реже аморфными головками. Зачастую сперматозоиды пациентов с глобозооспермией имеют и другие морфологические аномалии, в частности закрученный вокруг головки жгутик и цитоплазматическую каплю большого размера вокруг головки и жгутика [30,31], но эти дефекты не являются специфичными только для глобозооспермии. Выделяют глобозооспермию первого типа, при которой 100% сперматозоидов обладают описанными выше морфологическими особенностями, и глобозооспермию второго типа (частичную глобозооспермию), при которой 50–90% сперматозоидов не имеют акросомы, а их головки могут быть округлыми или аморфными [32].

*Генетические варианты, вызывающие глобозооспермию.* К настоящему времени в литературе обнаружены сведения о 14 генах, патогенные варианты в которых вызывают глобозооспермию у человека (см. табл. 1, табл. 1 Приложения). Патогенные варианты в генах *DPY19L2* и *SPATA16* наиболее часто встречаются у пациентов с глобозооспермией и описаны в нескольких современных обзорах [24, 33]. Патогенные варианты в гене *DPY19L2* ответственны за 70% случаев глобозооспермии первого типа у человека [34]. Белок, кодируемый геном *DPY19L2*, является трансмембранным белком, который локализован на внутренней ядерной оболочке развивающейся сперматиды. Белок необходим для формирования белковых мостиков между ядром и акроплаксомой и взаимодействует с белками SUN5 и KASH, входящими в комплекс LINC, который обеспечивает взаимодействие цитоскелета в цитозоле и микротрубочек, входящих в состав нуклеоплазмы [33]. Взаимодействие между акроплаксомой и ядром имеет важнейшее значение для удлинения ядра сперматиды и присоединения акросомного пузырька к ядру [17], поэтому сперматозоиды у мышей, нокаутных по гену *Dpy19l2*, имеют головки округлой формы без акросомы [35].

Белок, кодируемый геном *SPATA16*, локализован на мембранах аппарата Гольджи и проакросомальных везикул. Известен ряд патогенных

вариантов в этом гене, вызывающих глобозооспермию у человека, которые включают делеции экзона 2 [36] и части экзона 1 [34], а также замену 848G>A [37]. Интересно, что введение в этот ген замены, аналогичной 848G>A, с помощью технологии CRISPR/Cas 9, не приводило к потере фертильности и глобозооспермии у подопытных мышей, а удаление экзона 4 гена *Spata16* вызывало у них блокаду спермиогенеза и бесплодие, но не глобозооспермию [38]. Вероятно, разные патогенные варианты одного и того же гена имеют различное влияние на структуру белка и соответственно различные последствия для сперматогенеза.

Белок, кодируемый геном *SPACA1*, располагается на внутренней акросомальной мембране сперматид и, взаимодействуя с актино-подобным белком 7A (ACTL7A), участвует в прикреплении акросомального пузырька к акроплаксоме [33]. Патогенный вариант (NM\_030960.2: c.53G>A; p.Trp18\*) в этом гене был обнаружен у двух братьев из кровнородственной китайской семьи, страдающих глобозооспермией типа 1 [39]. Мыши, нокаутные по гену *Spaca1*, характеризуются сперматозоидами с головками округлой формы, уменьшенным размером акросомы, а также жгутиками, закрученными вокруг головки, нарушением строения митохондриального аппарата, эктопической локализацией жгутика. Отсутствие белка SPACA1 приводит к нарушению формирования акроплаксомы и соответственно удлинению ядра развивающейся сперматиды [38].

Гомозиготная замена c.21657G>A гена *PICK1* была обнаружена у одного из трех пациентов, страдающих глобозооспермией типа 1 [40], однако в литературе нет сведений о наличии других патогенных вариантов этого гена, приводящих к глобозооспермии. Мыши, нокаутные по этому гену, характеризовались фрагментацией акросомы и нарушением удлинения ядра на ранних стадиях спермиогенеза, вероятно, в результате нарушения почкования проакросомальных везикул [41].

Установлено наличие ряда патогенных вариантов в гене *ZPBP* у пациентов с глобозооспермией [42, 43]. Белок, кодируемый геном *ZPBP*, располагается на внутренней акросомальной мембране и, вероятно, необходим для корректной сборки белков матрикса проакросомальных пузырьков и их компактизации во время формирования акросомы. Сперматозоиды мышей, нокаутных по этому гену, имеют головки округлой формы [44].

Патогенный вариант в гене *CCDC62* (гомозиготная замена c.442C>T; p.Gln148\*) обнаружен у двух неродственных пациентов с глобозооспермией в исследовании Oud с соавт. [42]. Мыши, нокаутные по гену *Ccdc62*, имели сперматозоиды с аморфной головкой и закрученным жгутиком [45]. Авторы показали, что белок CCDC62 взаимодействует с



белком GOPC, необходимым для транспорта проакросомальных везикул и, как предполагается, модулирует его функцию, хотя точная функция белка CCDC62 остается неизвестной.

Патогенные варианты генов *CCNB3* (NM\_033031.3:c.1862dupT), *CHPT1* (NM\_020244.3:c.714dup), *PIWIL4* (NM\_152431.3:c.1861G>A и c.2503C>A) обнаружены у пациентов с глобозооспермией в исследовании Li с соавт. [46], которое включало экзомное секвенирование пациентов из Китая с глобозооспермией. В литературе более не найдено упоминаний о влиянии генетических вариантов в этих генах на морфологию сперматозоидов у человека. Нарушение экспрессии гена циклина В3 (*CCNB3*) сопровождалось появлением аномалий формы головки у лабораторных мышей. Этот ген экспрессируется в мейозе на стадиях лептотены и зиготены, но его точная роль в спермиогенезе не установлена [47]. Для генов *CHPT1*, *PIWIL4* к настоящему времени не проводилось исследований, касающихся их роли в морфогенезе сперматозоидов.

Делеция (с.259del) в гене *SPACDR* (также известного как *C7orf61*) была идентифицирована у пациента с глобозооспермией в единственном исследовании [42], и к настоящему времени не описано животных моделей глобозооспермии с нарушением функционирования этого гена. Продукт этого гена локализован в акросоме [42], но его функция в спермиогенезе остается невыясненной к настоящему времени.

Несколько патогенных вариантов в гене *AGFG1* (также известном как *HRB*) были идентифицированы у пациентов с глобозооспермией [48]. Мыши с инактивированным геном *Hrb* являются одной из моделей глобозооспермии [43], однако исследование, упомянутое выше, является единственным, которое показало влияние вариантов гена *HRB* на морфологию сперматозоидов у человека. Белок HRB локализован на поверхности проакросомальных пузырьков и необходим для их слияния при образовании акросомы [17].

Замена (с.338A>G) в гене *C2CD6* была обнаружена у пациента с глобозооспермией типа 2 [42]. Белок, кодируемый этим геном, согласно данным анализа сети белковых взаимодействий STRING, взаимодействует с белками APTA16 и ZPBP важными для формирования акросомы [33], но его точная роль в процессе спермиогенеза остается невыясненной.

Делеция в экзоне 1 (с.1271del) [42] и делеция в экзоне 3 (с.416\_437del) [49] были обнаружены у пациентов с глобозооспермией типа 2. Белок GGN экспрессируется в семенниках и локализован в сперматоцитах на стадии поздней пахитены и круглых сперматидеях, но его роль в спермиогенезе

остается неясной, нет также сведений о животных, нокаутных по этому гену.

Более 90% сперматозоидов у пациентов с патогенными вариантами в гене *TEKT3* (с.543\_547delinsTTGAT:p.Glu182\*, с.548G>A; с.752A>C) имели сперматозоиды с гипоплазией акросомы [50]. Отсутствие или недостаточное развитие акросомы является характерным морфологическим признаком глобозооспермии наряду с круглыми головками, однако авторы не описывают форму головок сперматозоидов. Мыши, нокаутные по гену *Tekt3*, имели нормальную морфологию головок сперматозоидов, но сниженную подвижность и структурные нарушения жгутика сперматозоидов [51]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о важной роли тектина 3, а также других тектинов в формировании структуры жгутика и обеспечении подвижности сперматозоидов [50], однако белок ТЕКТ3 необходим для нормального формирования акросомы.

*Синдром множественных аномалий жгутика сперматозоидов и дисплазия фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов*

*Описание фенотипа и распространенность.* Синдром множественных аномалий жгутика сперматозоидов (МАЖС) — форма астенотератозооспермии, при которой большинство сперматозоидов в эякуляте неподвижны и имеют различные аномалии строения жгутика — изгиб (ось жгутика образует угол более 90° по отношению к длинной оси головки сперматозоида), закрученные, короткие жгутики, жгутики нерегулярной толщины или их отсутствие [26, 52]. Какие-либо из этих аномалий наблюдаются в 60–100% сперматозоидов у пациентов с МАЖС. Частота возникновения синдрома МАЖС в настоящее время неизвестна, поскольку подсчет встречаемости различных морфологических аномалий сперматозоидов и их ультраструктурное исследование необходимы для диагностики данного синдрома, но эти трудоемкие методы редко используются в клинической практике [53]. Следует также отметить, что тератозооспермия с преобладанием в эякуляте сперматозоидов с короткими жгутиками нерегулярной толщины выделяется рядом авторов [54, 55] в отдельный тип тератозооспермии — дисплазию фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов (ДФОЖС), поскольку характерным признаком данного синдрома является наличие выраженных ультраструктурных аномалий именно фиброзной оболочки жгутика — наличие утолщенных многослойных колец вокруг аксономы, нарушение расположения латеральных колонн (lateral columns) и наружных плотных волокон [6]. Однако другие авторы считают ДФОЖС частным случаем синдрома МАЖС, поскольку оба эти синдрома имеют сходные ультраструктурные признаки [26, 52].



*Генетические варианты, вызывающие синдром множественных аномалий жгутика сперматозоидов и дисплазию фиброзной оболочки жгутика сперматозоидов.* К настоящему времени выявлены патогенные варианты 41 гена, которые ассоциированы с возникновением синдрома МАЖС (см. табл. 1, табл. 1 Приложения). Это гены, которые кодируют белки, входящие в состав центральной пары микротрубочек (*SPEF2*, *SPAG6*, *CFAP69*), внешних динеиновых ручек (*DNAH8*, *DNAH17*, *CFAP43*, *CFAP44*, *CCDC39*, *CCDC40*), радиальных спиц (*CFAP61*, *CFAP91*, *CFAP206*, *CFAP251*), внутренних динеиновых ручек (*DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH6*, *DNAH7*, *DNAH10*, *WDR63*), белки, участвующие в сборке жгутика (*TTC21A*, *TTC29*, *WDR19*, *IFT74*, *ARMC2*, *CCDC34*, *DNHD1*, *QRICH2*), центросомы (*CEP135*, *DZIP1*), фиброзной оболочки жгутика (*FSIP2*, *AKAP3*, *AKAP4*), наружных плотных волокон (*ODF2*, *CFAP58*), а также другие белки (*AK7*, *CFAP47*, *CFAP65*, *CFAP70*, *CFAP74*, *BRWD1*, *STK33*, *USP26*, *DRC1*), необходимые для транспорта молекул по микротрубочкам жгутика [52]. Поскольку структура жгутика сперматозоидов сходна с таковой для ресничек, покрывающих поверхность клеток многих других тканей организма — эпителия дыхательных путей, желудочков мозга и т.д., патогенные варианты некоторых генов (*SPEF2*, *DRC1*, *DNAH8*, *CFAP61*, *DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH6*, *DNAH7*, *WDR63*, *CCDC39*, *CCDC40*, *AK7*, *CFAP47*, *BRWD1*) вызывают не только МАЖС, но и синдром, называемый первичной цилиарной дискинезией (ПЦД), для которого, помимо МАЖС, характерны частые заболевания дыхательных путей, отставание в физическом развитии, изменение концевых фаланг пальцев, обратное расположение внутренних органов [56]. Первичная цилиарная дискинезия в ряде случаев ассоциирована с синдромом множественных аномалий жгутика сперматозоидов [57]. Подробная информация о функции, механизмах фенотипического проявления генов, связанных с синдромом МАЖС, изложена в нескольких современных обзорах [26, 52], поэтому в настоящей работе мы не будем останавливаться на этих вопросах. Однако интересно отметить, что некоторых генов могут вызывать не только синдром МАЖС, но и аномалии головки, приводя к развитию полиморфной тератозооспермии. В частности, у пациентов с патогенными вариантами (с.2454A>T и с.7706G>A) в гене *DNAH6* отмечались сперматозоиды с круглыми головками и ацефалические сперматозоиды [58]. Другие патогенные варианты этого же гена (с.5264C>T и с.8726A>G) приводили к развитию полиморфной тератозооспермии, при которой в эякуляте преобладали закрученные жгутики сперматозоидов, а также аморфные и вытянутые головки [59]. В статье [60] сообщается о развитии классического синдрома МАЖС у пациентов с патогенными вариантами гена *DNAH6* (с.6582 C>

A, с.11258 G> A), но нет сведений о представленности других типов морфологических дефектов сперматозоидов. Было показано, что патогенный вариант (NM\_145038.5:с.1296 G>A) гена *DRC1* вызывает только развитие синдрома МАЖС [61], однако другие патогенные варианты (NM\_145038.5:с.С1660>Т и NM\_145038.5:с.С238>Т) того же гена приводят к развитию полиморфной тератозооспермии, при которой отмечаются морфологические аномалии как жгутика, так и головки сперматозоидов [62]. Таким образом, патогенные варианты в генах, кодирующих белки, связанные с функционированием микротрубочек, могут затрагивать не только сборку структур жгутика сперматозоидов, но и морфогенез головки.

Патогенные варианты ряда генов (*AKAP3*, *AKAP4*, *DNAH1*, *DNAH2*, *CFAP43*, *CFAP44*, *CFAP58*, *CCDC40*, *QRICH2*) описаны как вызывающие синдром ДФОЖС [55, 63], однако для этих же генов имеются патогенные варианты, вызывающие синдром МАЖС. Кроме того, исследование [55], включавшее секвенирование экзонов у девяти пациентов из Аргентины и 12 пациентов из Австралии, страдавших ДФОЖС, позволило выявить патогенные варианты генов *SPPL2C* (с.634C>T), *ATP2B4* (с.376G>C) *CEP350* (с.229A>G) *CEP290* (с.5998A>G и с.1092T>G) *TPTE2* (с.715C>T) *MDC1* (с.472C>T и с.2134C>T), которые вызывают ДФОЖС, но ранее не были выявлены у пациентов, страдающих МАЖС. Нокаут гена *Spp12c* приводит к потере удлиненных сперматид и сниженной подвижности сперматозоидов у самцов мышей [64]. Белок, кодируемый этим геном, — протеаза, участвует в регуляции транспорта и слияния везикул, взаимодействуя с белками SNARE, обеспечивающими слияние внутриклеточных транспортных везикул [65].

#### *Ацефалия сперматозоидов*

*Описание фенотипа и распространенность.* Ацефалия сперматозоидов — это форма тератозооспермии, при которой в 90–100% сперматозоидов в эякуляте головка отделена от жгутика. Головки зачастую фагоцитируются при транспорте сперматозоидов в эпидидимисе, и тогда в эякуляте представлены главным образом жгутики, лишённые головок, с маленькой цитоплазматической капелькой на конце (pin heads, булавовидные головки) и лишь иногда головки без жгутика. Шейка сперматозоида (в англоязычной литературе именуемая как head–tail coupling apparatus, НТСА), состоит из проксимальной и дистальной центриолей, а также капитулума. Все эти структуры окружены снаружи сегментированными колонками. Капитулум покрывает проксимальную центриоль со стороны головки сперматозоида и связан с базальной пластинкой, располагающейся в имплантационной ямке головки сперматозоида, соединяя головку и шейку. В зависимости от ультраструктурных

дефектов шейки сперматозоида ацефалию сперматозоидов подразделяют на тип 1 (отсутствие соединения между двумя центриолями), тип 2 (отсутствие соединения между проксимальной центриолью и головкой сперматозоида) и тип 3, который проявляется как нарушения соединения между дистальной центриолью и средней частью сперматозоида [66, 67].

*Генетические варианты, вызывающие ацефалию сперматозоидов.* В настоящее время описаны патогенные варианты в девяти генах, приводящие к ацефалии сперматозоидов (табл. 1 Приложения). Первым геном, для которого показана связь с ацефалией сперматозоидов, был *SUN5*, целый ряд патогенных вариантов которого выявлен у мужчин с ацефалией сперматозоидов [68]. Этот ген, ответственный примерно за 40% случаев ацефалии сперматозоидов, кодирует трансмембранный белок, играющий важную структурную роль в НТСА. Этот белок также необходим для формирования ядерной оболочки в ходе спермиогенеза [69]. Белок *SUN5* принадлежит к семейству белков *SUN*, главная функция которых заключается в обеспечении взаимосвязи между цитоскелетом ядра клетки и цитоскелетом в ее цитозоле. Белки *SUN* входят в состав белкового комплекса *LINC* совместно с белками семейства *KASH* (*Nesprin1*–*Nesprin4*). Показано, что белок *SUN5* взаимодействует с *Nesprin3* и белком наружной фиброзной оболочки сперматозоидов *ODF1*, образуя совместно с ними триплетную структуру, которая необходима для прикрепления шейки сперматозоида к его головке [70]. Самцы мышей, нокаутных по этому гену, бесплодны и характеризуются наличием ацефалии сперматозоидов и глобозоспермией [71].

Ген *PMFBP1*, патогенные варианты которого встречаются в 30% случаев ацефалии сперматозоидов, кодирует протеин, который во взаимодействии с белками *SUN5* и *SPATA6* участвует в формировании НТСА [72]. Известно несколько патогенных вариантов гена *PMFBP1*, которые вызывают ацефалию сперматозоидов у человека [73]. Мыши, нокаутные по гену *PMFBP1*, характеризуются ацефалией сперматозоидов, а также изменением содержания 159 различных белков в сперматозоидах, которые ассоциированы с терминами генной онтологии, описывающими везикулярный транспорт в комплексе Гольджи [74].

Продукт гена *TSGA10*, локализованный преимущественно в жгутике и средней части сперматозоида, играет важную роль в организации и позиционировании центриолей, а также сборке митохондриальной оболочки сперматозоида. Самцы мышей, нокаутных по этому гену, бесплодны из-за тотальной астенозооспермии [75]. Найдена делеция (*NM\_182911:exon7:c.211delG:p.A71Hfs\*1*) в этом гене, приводящая к ацефалии сперматозоидов у человека [76].

Белок, кодируемый геном *BRDT*, является транскрипционным фактором, регулирующим активность генов, вовлеченных в перестройку хроматина и внутриклеточный транспорт. Патогенный вариант этого гена (*NM\_207189:exon19:c.G2783>A*) у человека вызывал ацефалию сперматозоидов и изменение экспрессии более 900 генов, вовлеченных в регуляцию внутриклеточного транспорта и организации хроматина [77].

Мужчины с патогенным вариантом гена *HOOK1* (*p.Q286R*) характеризовались ацефалией сперматозоидов и нарушением ультраструктуры имплантационной ямки и базальной пластинки сперматозоидов [78]. Белок *HOOK1* связывается с микротрубочками цитоскелета и внутриклеточными органеллами и участвует во внутриклеточном транспорте, включая транспорт белков по микротрубочкам манжеты развивающейся сперматиды [79]. Развитие ацефалии сперматозоидов у людей с данным патогенным вариантом гена *HOOK1* свидетельствует о важности транспорта белков по микротрубочкам манжеты для нормального формирования НТСА и жгутика сперматозоида.

Белок, кодируемый геном *CEP112*, является важным структурным компонентом centrosомы, и патогенные варианты (*c.496C>T*, *c.2074C>T*, *c.2104C>T*) в этом гене обнаружены у двух пациентов с ацефалией сперматозоидов [80].

Продукт гена *SPATC1L* локализован в centrosомах круглых сперматид и шейке зрелых сперматозоидов и увеличивает активность серин-треониновой протеинкиназы А, которая является одним из основных регуляторов процесса спермиогенеза. Кроме того, этот белок необходим и для обеспечения стабильности НТСА; для мышей, нокаутных по гену *Spatc1l*, характерны ацефалические сперматозоиды [81]. Патогенные варианты этого гена (*c.910C>T:p.Arg304Cys* и *c.994G>T:p.Glu332X*) были обнаружены у пациента с ацефалией сперматозоидов [82].

Патогенный вариант (*c.619C>T*) в гене *SPATA20* выявлен у пациента с ацефалией сперматозоидов; мыши, нокаутные по этому гену, также характеризовались ацефалией сперматозоидов. При этом патогенный вариант в гене *SPATA20* вызывал не только отсутствие его экспрессии, но и снижение уровня белка *SPATA6*, а также нарушение ультраструктуры шейки сперматозоидов, что свидетельствует о необходимости взаимодействия этих белков в обеспечении стабильной структуры НТСА [83]. Кроме того, описан другой патогенный вариант (*c.1957T>A*) этого гена у пациента с частичной глобозоспермией и небольшим числом ацефалических сперматозоидов [84]. Белок, кодируемый этим геном, принадлежит к семейству белков *SPATA*, которые экспрессируются преимущественно в семенниках и играют исключительно важную

роль в сперматогенезе и оплодотворении, формировании акросомы, сборке митохондриальной оболочки, удалении цитоплазмы во время спермиогенеза, обеспечении подвижности сперматозоидов [85]. Полученные данные свидетельствуют также о важности одного из белков этого семейства для нормального формирования шейки сперматозоида.

### Макрозооспермия

*Описание фенотипа и распространенность.* Макрозооспермия – тип мономорфной тератозооспермии, встречающийся менее чем в 1% случаев мужского бесплодия, при которой 95–100% сперматозоидов в эякуляте имеют аморфные головки аномально большого размера и несколько жгутиков [9].

*Генетические варианты, вызывающие макрозооспермию сперматозоидов.* В подавляющем большинстве случаев макрозооспермия обусловлена патогенными вариантами в гене *AURKC*. Этот ген кодирует белок Aurora Kinase C, который является членом семейства киназ Aurora и необходим для разрушения синаптонемного комплекса и расхождения хромосом во время мейоза [86], поэтому большинство аномальных сперматозоидов у пациентов с макрозооспермией имеют диплоидный набор хромосом [9]. В настоящее время известно шесть патогенных вариантов гена *AURKC*, вызывающих макрозооспермию: с.144delC, с.744C>A, с.686G>A, с.436-2A>G [87], с.572C>T [88], с.269G>A [89]. Мыши, нокаутные по гену *Aurkc*, характеризуются снижением фертильности и дефектами сперматозоидов, включающими нарушение конденсации хроматина, отсутствие акросомы и аномальную форму головок [90].

Кроме того, у пациента, страдающего олигозооспермией и макрозооспермией, был выявлен патогенный вариант (с.1520\_1523del) гена *ZMYND15* [91]. Белок, кодируемый этим геном, подавляет экспрессию ряда генов, которые в норме экспрессируются только на поздних стадиях сперматогенеза. Инактивация гена *Zmynd15* у мышей приводила к ранней активации экспрессии генов *Prm1*, *Tnp1*, *Spem1*, *Catsper3*, потере сперматид и азооспермии [92]. Обнаружен ряд патогенных вариантов гена *ZMYND15*, вызывающих азооспермию у человека [91]. Результаты этих исследований показывают, что разные патогенные варианты одного и того же гена могут приводить к различным фенотипическим проявлениям.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Спермиогенез – сложный многоступенчатый процесс дифференцировки сперматиды, изначально имеющей морфологию типичной эукариотической клетки, в дифференцированный сперматозоид, имеющий видоспецифичную форму. Данный

процесс требует координированного взаимодействия множества белков и экспрессии множества генов. Патогенные варианты любого из этих генов могут приводить к нарушениям процесса спермиогенеза и появлению различных морфологических дефектов сперматозоидов, а также снижению подвижности сперматозоидов из-за структурных аномалий жгутика или повышению уровня фрагментации ДНК сперматозоидов вследствие нарушения процесса компактизации хроматина.

В результате проведенного анализа литературы найдены сведения о 109 генах, патогенные варианты которых вызывают различные формы тератозооспермии у человека. Учитывая сложность процесса спермиогенеза, следует ожидать, что данный список генов не является исчерпывающим. Следовательно, поиск новых генов, вовлеченных в контроль морфологии сперматозоидов у человека, а также поиск новых патогенных вариантов в уже известных генах являются актуальной задачей. Упростить ее может понимание биологических процессов, которые лежат в основе морфогенеза сперматозоидов. Результаты анализа литературы, а также функциональной аннотации полученного набора генов, для которых уже выявлены патогенные варианты, приводящие к формированию тератозооспермии у человека, показывают, что каждая форма тератозооспермии обусловлена нарушением специфических биологических процессов в ходе сперматогенеза. Однако процессы, связанные с организацией и функционированием цитоскелета, а также внутриклеточного транспорта белков, вносят определяющий вклад в развитие всех форм тератозооспермии. Это также подтверждается данными многочисленных многолетних исследований ультраструктурных изменений в сперматиде разных видов животных при нормальном протекании спермиогенеза, а также работ на нокаутных мышах, которые являются животными моделями генетически обусловленной тератозооспермии. В частности, найдены вызывающие глобозооспермию патогенные варианты генов, которые кодируют белки P1CK1, Dru1912, необходимые для транспорта и точного позиционирования проакросомальных везикул. Патогенные варианты гена *AGFG1*, кодирующего белок Hrb, который необходим для «распределения» акросомального пузырька по поверхности ядра, также приводят к развитию глобозооспермии [48]. Кроме того, процесс образования акросомы и связанных с ней структур цитоскелета (акроплаксома и перинуклеарной теки) происходит в начале спермиогенеза. При этом акроплаксома и перинуклеарная тека являются структурами, передающими на ядро экзогенные силы, генерируемые актиновыми филаментами клеточного скелета, окружающими сперматиду, что необходимо для формирования видоспецифичной формы головки [16, 93]. Поэтому патогенные варианты генов,



продукты которых необходимы для формирования акропласм (ACTL7A) и перинуклеарной теки (CCIN, ACTL9) приводят не только к появлению аномалий акросомы, но и разнообразных дефектов формы головки.

Следует отметить, что патогенные варианты генов (*IQCN*, *CATIP*, *KATNAL2*), которые вовлечены в контроль процессов динамической реорганизации цитоскелета, включающей как быструю полимеризацию актиновых филаментов и сборку микротрубочек, так и их разрушение, вызывают нарушение формирования нескольких структур сперматозоида и развитие полиморфной тератозооспермии. Например, нарушение сборки микротрубочек манжеты у людей с патогенным вариантом гена *IQCN* приводит к тератозооспермии с разнообразными аномалиями формы головки [13]. Полиморфная тератозооспермия, при которой в эякуляте наблюдаются морфологические дефекты сперматозоидов нескольких типов, значительно чаще встречается в популяциях человека по сравнению с мономорфной тератозооспермией и имеет как средовые, так и генетические причины. Поиск патогенных вариантов генов, ассоциированных с полиморфной тератозооспермией, может быть полезным для выявления генетических причин тератозооспермии и разработки персонализированной тактики лечения.

Следует отметить, что проанализированная информация о влиянии различных генетических вариантов на морфологию сперматозоидов получена главным образом в результате исследований жителей Китая и стран Европы. Широкомасштабные популяционные исследования, проведенные в Сибирском регионе, позволили выявить региональные и этнические различия в качестве эякулята у российских мужчин, включая морфологию сперматозоидов [94, 95], которые могут быть обусловлены как средовыми, так и генетическими факторами. Кроме того, в результате секвенирования экзонов 145 мужчин, проживающих в Западной и Восточной Сибири, были установлены SNP, ассоциированные, в зависимости от этнической принадлежности, со снижением качества эякулята, включая ухудшение морфологии сперматозоидов [96]. Однако поиск патогенных генетических вариантов, вызывающих различные типы тератозооспермии у российских мужчин, не проводился. Данные, полученные в результате проведенного анализа литературы, могут быть использованы для идентификации новых патогенных вариантов генов, вызывающих различные формы тератозооспермии у российских мужчин с учетом этнической принадлежности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы позволил выявить 109 генов, патогенные варианты которых ассоциированы с развитием различных форм тератозооспермии у человека. Эти гены кодируют белки, участвующие главным образом в формировании и функционировании цитоскелета и внутриклеточном транспорте белков — процессах, имеющих важнейшее значение для нормального протекания спермиогенеза. Впервые систематизирована информация о патогенных вариантах генов, связанных с проявлением полиморфной тератозооспермии. Установлено, что патогенные варианты генов, нарушающие процессы реорганизации структур цитоскелета, в особенности связанных с формированием акросомы, а также процессы внутриклеточного транспорта, аутофагию, регуляцию транскрипции, систему убиквитинирования—деубиквитинирования белков затрагивают морфогенез разных структур сперматозоида и приводят к появлению множественных морфологических дефектов. Дальнейшее изучение тонких молекулярных процессов, лежащих в основе функционирования цитоскелета и внутриклеточного транспорта, а также поиск патогенных вариантов в генах, регулирующих эти процессы, необходимо для понимания механизмов развития тератозооспермии.

Работа выполнена в рамках государственного задания FWNR-2022-0021 «Генофонды населения Сибири, генетические маркеры заболеваний человека и молекулярные основы формирования патологических процессов».

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vander Borgh M., Wyns C.* Fertility and infertility: Definition and epidemiology // *Clin. Biochemistry*. 2018. V. 62. P. 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th edn. World Health Organization: Geneva, 2021.
3. *Auger J., Jouannet P., Eustache F.* Another look at human sperm morphology // *Hum. Reproduction*. 2016. V. 31. № 1. P. 10–23. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev251>
4. *Brahem S., Elghezal H., Ghédir H. et al.* Cytogenetic and molecular aspects of absolute teratozoospermia: Comparison between polymorphic and monomorphic forms // *Urology*. 2011. V. 78. № 6. P. 1313–1319. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.08.064>

5. Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility // *Nat. Reviews Urology*. 2018. V. 15. № 6. P. 369–384.  
<https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
6. Chemes H.E. Phenotypic varieties of sperm pathology: Genetic abnormalities or environmental influences can result in different patterns of abnormal spermatozoa // *Animal Reproduction Sci*. 2018. V. 194. P. 41–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.074>
7. Ma Y., Xie N., Xie D. et al. A novel homozygous *FBXO43* mutation associated with male infertility and teratozoospermia in a consanguineous Chinese family // *Fertility and Sterility*. 2019. V. 111. № 5. P. 909–917.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.01.007>
8. Zhao S. Y., Meng L. L., Du Z. et al. A novel loss-of-function variant in *PNLDC1* inducing oligo-asthenoteratozoospermia and male infertility // *Asian J. Andrology*. 2023. V. 25. № 5. P. 643–645.  
<https://doi.org/10.4103/aja20233>
9. de Braekeleer M., Nguyen M. H., Morel F., Perrin A. Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: A review // *J. Assisted Reproduction and Genet*. 2015. V. 32. № 4. P. 615–623.  
<https://doi.org/10.1007/s10815-015-0433-2>
10. Evgeni E., Lymberopoulos G., Touloupidis S., Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men // *Andrologia*. 2015. V. 47. № 10. P. 1166–1174.  
<https://doi.org/10.1111/and.12398>
11. Mangiarini A., Paffoni A., Restelli L. et al. Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects // *Andrology*. 2013. V. 1. № 6. P. 838–844.  
<https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00138.x>
12. Oumaima A., Tesnim A., Zohra H. et al. Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation // *Environmental Sci. and Pollution Res*. 2018. V. 25. № 14. P. 13775–13786.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1417-4>
13. Wang Y., Chen G., Tang Z., Mei X et al. Loss-of-function mutations in *IQCN* cause male infertility in humans and mice owing to total fertilization failure // *Mol. Hum. Reproduction*. 2023. V. 29. № 7.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaad018>
14. Zakrzewski P., Lenartowska M., Buss, F. Diverse functions of myosin VI in spermiogenesis // *Histochemistry and Cell Biol*. 2021. V. 155. № 3. P. 323–340.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-020-01954-x>
15. Wei Y. L., Yang, W. X. The acroframosome-acroplaxome-manchette axis may function in sperm head shaping and male fertility // *Gene*. 2018. № 660. P. 28–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.059>
16. Teves M. E., Roldan E. R. S. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection // *Physiol. Reviews*. 2022. V. 102. № 1. P. 7–60.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2020>
17. Kierszenbaum A.L., Tres L.L. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head // *Arch. of Histology and Cytology*. 2004. V. 67. № 4. P. 271–284.  
<https://doi.org/10.1679/aohc.67.271>
18. Lehti M. S., Sironen A. Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis // *Reproduction*. 2016. V. 151. № 4. P. R43–R54.  
<https://doi.org/10.1530/REP-15-0310>
19. Berruti G., Paiard C. The dynamic of the apical ectoplasmic specialization between spermatids and Sertoli cells: The case of the small GTPase Rap1 // *Biomed. Res. Int*. 2014.  
<https://doi.org/10.1155/2014/635979>
20. Dai J., Zhang, T., Guo J. et al. Homozygous pathogenic variants in *ACTL9* cause fertilization failure and male infertility in humans and mice // *Am. J. Hum. Genet*. 2021. V. 108. № 3. P. 469–481.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.02.004>
21. Zhou X., Xi Q., Jia W. et al. A novel homozygous mutation in *ACTL7A* leads to male infertility // *Mol. Genet. and Genomics*. 2023. V. 298. № 2. P. 353–360.  
<https://doi.org/10.1007/s00438-022-01985-0>
22. Chang Y., Jiang X., Liu W. et al. Molecular genetic mechanisms of teratozoospermia // *Zygote* (Cambridge, England). 2023. V. 31. № 2. P. 101–110.  
<https://doi.org/10.1017/S0967199422000594>
23. Kherraf Z. E., Conne B., Amiri-Yekta A., Kent M. C. Creation of knock out and knock in mice by CRISPR/Cas9 to validate candidate genes for human male infertility, interest, difficulties and feasibility // *Mol. and Cellular Endocrinology*. 2018. V. 46 № 8. P. 70–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.002>
24. Crafa A., Condorelli R. A., La Vignera S. et al. Globozoospermia: A case report and systematic review of literature // *The World J. Men's Health*. 2023. V. 41. № 1. P. 49–80.  
<https://doi.org/10.5534/wjmh.220020>
25. Beurois J., Cazin C., Kherraf Z. E. Genetics of teratozoospermia: back to the head // *Best Practice & Res. Clin. Endocrinology & Metabolism*. 2020. V. 34. № 6.  
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101473>
26. Touré A., Martinez G., Kherraf Z. E., Cazin C. et al. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail // *Hum. Genet*. 2021. V. 140. № 1. P. 21–42.  
<https://doi.org/10.1007/s00439-020-02113-x>
27. Rappaport N., Twik M., Plaschkes I. et al. MalaCards: An amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search // *Nucl. Acids Res*. 2017. V. 45. P. 877–887.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1012>

28. *Davis A.P., Wiegers T. C., Johnson R.J. et al.* Comparative Toxicogenomics Database (CTD): Update 2023 // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51(D1). P. D1257–D1262. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac833>
29. *Demenkov P.S., Ivanisenko T., Kolchanov N. A., Ivanisenko V. A.* ANDVisio: A new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem // *In Silico Biol.* 2011. V. 11. № 3. P. 149–161. <https://doi.org/10.3233/ISB-2012-0449>
30. *Ricci G., Andolfi L., Zabucchi G. et al.* Ultrastructural morphology of sperm from human globozoospermia // *BioMed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/798754>
31. *Sáez-Espinosa P., Robles-Gómez L., Ortega-López L. et al.* Immunofluorescence and high-resolution microscopy reveal new insights in human globozoospermia // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 3. <https://doi.org/10.3390/ijms23031729>
32. *Dam A. H., Ramos L., Dijkman H. B. et al.* Morphology of partial globozoospermia // *J. Andrology.* 2011. V. 32. № 2. P. 199–206. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.009530>
33. *Moreno R. D.* Human globozoospermia-related genes and their role in acrosome biogenesis // *WIREs Mechanisms of Disease.* 2023. V. 15 № 2. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1589>
34. *Elinati E., Kuentz P., Redin C. et al.* Globozoospermia is mainly due to *dpy19l2* deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 16. P. 3695–3702. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc200>
35. *Pierre V., Martinez G., Coutton C. et al.* Absence of *Dpy19l2*, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus // *Development (Cambridge).* 2012. V. 139. № 16. P. 2955–2965. <https://doi.org/10.1242/dev.077982>
36. *Ghédír H., Braham A., Viville S. et al.* Comparison of sperm morphology and nuclear sperm quality in SPATA16- and DPY19L2-mutated globozoospermic patients // *Andrologia.* 2019. V. 51. № 6. <https://doi.org/10.1111/and.13277>
37. *Dam A. H. D. M., Kosciński I., Kremer J. A. M. et al.* Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 4. P. 813–820. <https://doi.org/10.1086/521314>
38. *Fujihara Y., Satouh Y., Inoue N., Isotani A.* SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia // *Development (Cambridge).* 2012. V. 139. № 19. P. 3583–3589. <https://doi.org/10.1242/dev.081778>
39. *Chen P., Saiyin H., Shi R. et al.* Loss of SPACA1 function causes autosomal recessive globozoospermia by damaging the acrosome-acroplaxome complex // *Hum. Reproduction.* 2021. V. 36. № 9. P. 2587–2596. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab144>
40. *Liu G., Sh Q. W., Lu G. X.* A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia // *Asian J. Andrology.* 2010. V. 12. № 4. P. 556–560. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.47>
41. *Xiao N., Kam C., Shen C. et al.* PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation // *J. Clin. Investigation.* 2009. V. 119. № 4. P. 802–812. <https://doi.org/10.1172/JCI36230>
42. *Oud M. S., Okutman Ö., Hendricks L. A. et al.* Exome sequencing reveals novel causes as well as new candidate genes for human globozoospermia // *Hum. Reproduction (Oxford, England).* 2020. V. 35 № 1. P. 240–252. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez246>
43. *Yatsenko A. N., O'Neil D. S., Roy A. et al.* Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (*ZPBP1*) gene with abnormal sperm head morphology in infertile men // *Mol. Hum. Reproduction.* 2012. V. 18. № 1. P. 14–21. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar057>
44. *Lin Y.-N., Roy A., Yan W. et al.* Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis // *Mol. and Cellular Biol.* 2007. V. 27. № 19. P. 6794–6805. <https://doi.org/10.1128/mcb.01029-07>
45. *Li Y., Li C., Lin S. et al.* A nonsense mutation in *Ccdc62* gene is responsible for spermiogenesis defects and male infertility in *repro29/repro29* mice // *Biol. of Reproduction.* 2017. V. 96. № 3. P. 587–597. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.141408>
46. *Li Y., Wang Y., Wen Y. et al.* Whole-exome sequencing of a cohort of infertile men reveals novel causative genes in teratozoospermia that are chiefly related to sperm head defects // *Hum. Reproduction.* 2022. V. 37. № 1. P. 152–177. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab229>
47. *Refik-Rogers J., Manova K., Koff A.* Misexpression of cyclin B3 leads to aberrant spermatogenesis // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. № 17. P. 1966–1973. <https://doi.org/10.4161/cc.5.17.3137>
48. *Christensen G. L., Ivanov I. P., Atkins J. F. et al.* Identification of polymorphisms in the *Hrb*, *GOPC*, and *Csnk2a2* genes in two men with globozoospermia // *J. Andrology.* 2006. V. 27. № 1. P. 11–15. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05087>
49. *Celse T., Cazin C., Miettton F. et al.* Genetic analyses of a large cohort of infertile patients with globozoospermia, DPY19L2 still the main actor, GGN confirmed as a guest player // *Hum. Genet.* 2021. V. 140. № 1. P. 43–57. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02229-0>
50. *Liu Y., Li Y., Meng L. et al.* Bi-allelic human *TEKT3* mutations cause male infertility with



- oligoasthenoteratozoospermia owing to acrosomal hypoplasia and reduced progressive motility // *Hum. Mol. Genet.* 2023. V. 32 № 10. P. 1730–1740. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddad013>
51. Roy A., Lin Y. N., Agno J. E. et al. Tektin 3 is required for progressive sperm motility in mice // *Mol. Reproduction and Development.* 2009. V. 76. № 5. P. 453–459. <https://doi.org/10.1002/mrd.20957>
  52. Wang J., Wang W., Shen L. et al. Clinical detection, diagnosis and treatment of morphological abnormalities of sperm flagella: A review of literature // *Frontiers in Genet.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1034951>
  53. Wang W. L., Tu C. F., Tan Y. Q. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: What is new? // *Asian J. Andrology.* 2020. V. 22. № 3. P. 236–245. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_53\\_19](https://doi.org/10.4103/aja.aja_53_19)
  54. Sha Y., Yang X., Mei L. et al. DNAH1 gene mutations and their potential association with dysplasia of the sperm fibrous sheath and infertility in the Han Chinese population // *Fertility and Sterility.* 2017. V. 107. № 6. P. 1312–1318.
  55. Oud M.S., Houston B.J., Volozonoka L. et al. Exome sequencing reveals variants in known and novel candidate genes for severe sperm motility disorders // *Hum. Reproduction.* 2021. V. 36. № 9. P. 2597–2611.
  56. Horani A., Ferkol T. W. Understanding primary ciliary dyskinesia and other ciliopathies // *J. of Pediatrics.* 2021. V. 230. P. 15–22.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.11.040>
  57. Sironen A., Shoemark A., Patel M., Loebinger M. R. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility // *Cellular and Mol. Life Sci. CMLS.* 2020. V. 77. № 11. P. 2029–2048. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03389-7>
  58. Li L., Sha Y. W., Xu X. et al. DNAH6 is a novel candidate gene associated with sperm head anomaly // *Andrologia.* 2018. V. 50. № 4. <https://doi.org/10.1111/and.12953>
  59. Shao Z.-M., Zhu Y.-T., Gu M. et al. Novel variants in DNAH6 cause male infertility associated with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) and ICSI outcomes // *Asian J. Andrology.* 2023. <https://doi.org/10.4103/aja202328>
  60. Tu C., Nie H., Meng L. et al. Identification of DNAH6 mutations in infertile men with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella // *Sci. Reports.* 2019. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52436-7>
  61. Lei C., Yang D., Wang R. et al. DRC1 deficiency caused primary ciliary dyskinesia and MMAF in a Chinese patient // *J. Hum. Genet.* 2022. V. 67. № 4. P. 197–201. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00985-z>
  62. Zhang J., He X., Wu H. et al. Loss of DRC1 function leads to multiple morphological abnormalities of the sperm flagella and male infertility in human and mouse // *Hum. Mol. Genet.* 2021. V. 30. № 21. P. 1996–2011. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab171>
  63. Pereira R., Oliveira J., Ferraz L., Barros A. Mutation analysis in patients with total sperm immotility // *J. Assisted Reproduction and Genet.* 2015. V. 32. № 6. P. 893–902.
  64. Niemeyer J., Mentrup T., Heidasch R. et al. The intramembrane protease SPPL2c promotes male germ cell development by cleaving phospholamban // *EMBO Reports.* 2019. V. 20. № 3.
  65. Papadopoulou A.A., Müller S.A., Mentrup T. et al. Signal peptide peptidase-like 2c impairs vesicular transport and cleaves SNARE proteins // *EMBO Reports.* 2019. V. 20. № 3. doi: 10.15252/embr.201846451.
  66. Sha Y., Liu W., Li L., Serafimovski M. Pathogenic variants in ACTRT1 cause acephalic spermatozoa syndrome // *Frontiers in Cell and Developmental Biol.* 2021. № 9. 676246.
  67. Nie H., Tang Y., Qin W. Beyond acephalic spermatozoa: the complexity of intracytoplasmic sperm injection outcomes // *BioMed Res. Int.* 2020. 6279795.
  68. Zhu F., Wang F., Yang X. et al. Biallelic SUN5 mutations cause autosomal-recessive acephalic spermatozoa syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 99. № 4. P. 942–949. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.004>
  69. Wang Y., Xiang M. F. Genetic pathogenesis of acephalic spermatozoa syndrome: past, present, and future // *Asian J. Andrology.* 2022. V. 24. № 3. P. 231–237. <https://doi.org/10.4103/aja202198>
  70. Zhang D., Huang W. J., Chen G. Y. et al. Pathogenesis of acephalic spermatozoa syndrome caused by SUN5 variant // *Mol. Hum. Reproduction.* 2021. V. 27. № 5. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab028>
  71. Shang Y., Zhu F., Wang L. et al. Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail // *eLife.* 2017. V. 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.28199>
  72. Zhu F., Liu C., Wang F. et al. Mutations in PMFBP1 cause acephalic spermatozoa syndrome. // *Am. J. of Hum. Genet.* 2018. V. 103. № 2. P. 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.06.010>
  73. Moghaddam M., Mazaheri Moghaddam M., Hamzeiy H. et al. Genetic basis of acephalic spermatozoa syndrome, and intracytoplasmic sperm injection outcomes in infertile men: A systematic scoping review // *J. of Assisted Reproduction and Genet.* 2021. V. 38. № 3. P. 573–586.
  74. Sha Y. W., Wang X., Xu X. et al. Biallelic mutations in PMFBP1 cause acephalic spermatozoa // *Clin. Genet.* 2019. V. 95. № 2. P. 277–286. <https://doi.org/10.1111/cge.13461>

75. Luo G., Hou M., Wang B. et al. *Tsga10* is essential for arrangement of mitochondrial sheath and male fertility in mice // *Andrology*. 2021. V. 9. № 1. P. 368–375. <https://doi.org/10.1111/andr.1288>
76. Sha Y. W., Sha Y. K., Ji Z. Y. et al. *TSGA10* is a novel candidate gene associated with acephalic spermatozoa // *Clin. Genet*. 2018. V. 93. № 4. P. 776–783. <https://doi.org/10.1111/cge.13140>
77. Li L., Sha Y., Wang X., Li P. Whole-exome sequencing identified a homozygous *BRDT* mutation in a patient with acephalic spermatozoa // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 12. P. 19914–19922. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15251>
78. Chen H., Zhu Y., Zhu Z., Zhi E. Detection of heterozygous mutation in hook microtubule-tethering protein 1 in three patients with decapitated and decaudated spermatozoa syndrome // *J. Med. Genet*. 2018. V. 55. № 3. P. 150–157. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104404>
79. Maldonado-Báez L., Cole N. B., Krämer H., Donaldson J. G. Microtubule-dependent endosomal sorting of clathrin-independent cargo by Hook1 // *J. Cell Biol*. 2013. V. 201. № 2. P. 233–247. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208172>
80. Sha Y., Wang X., Yuan J. T., Zhu X. Loss-of-function mutations in centrosomal protein 112 is associated with human acephalic spermatozoa phenotype // *Clin. Genet*. 2020. V. 97. № 2. P. 321–328. <https://doi.org/10.1111/cge.13662>
81. Kim J., Kwon J. T., Jeong J. et al. *SPATC1L* maintains the integrity of the sperm head-tail junction // *EMBO Reports*. 2018. V. 19. № 9. <https://doi.org/10.15252/embr.201845991>
82. Li Y. Z., Li N., Liu W. S., Sha Y. W. Biallelic mutations in spermatogenesis and centriole-associated 1 like (*SPATC1L*) cause acephalic spermatozoa syndrome and male infertility // *Asian J. Andrology*. 2022. V. 24. № 1. P. 67–72. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_56\\_21](https://doi.org/10.4103/aja.aja_56_21)
83. Wang X., Jiang C., Dai S. et al. Identification of non-functional *SPATA20* causing acephalic spermatozoa syndrome in humans // *Clin. Genet*. 2023. V. 103. № 3. P. 310–319. <https://doi.org/10.1111/cge.14268>
84. Martinez G., Metzler-Guillemain C., Cazin C. et al. Expanding the sperm phenotype caused by mutations in *SPATA20*: A novel splicing mutation in an infertile patient with partial globozoospermia // *Clin. Genet*. 2023. V. 103. № 5. P. 612–614. <https://doi.org/10.1111/cge.14284>
85. Sujit K. M., Singh V., Trivedi S. et al. Increased DNA methylation in the spermatogenesis-associated (*SPATA*) genes correlates with infertility // *Andrology*. 2020. V. 8. № 3. P. 602–609. <https://doi.org/10.1111/andr.12742>
86. Wellard S. R., Schindler K., Jordan P.W. Aurora B and C kinases regulate chromosome desynapsis and segregation during mouse and human spermatogenesis // *J. Cell Sci*. 2020. V. 133. № 23.
87. Carmignac V., Dupont J.M., Fierro R. C. et al. Diagnostic genetic screening for assisted reproductive technologies patients with macrozoospermia // *Andrology*. 2017. V. 5. № 2. P. 370–380.
88. Bai S., Hu X., Zhao Y. et al. Compound heterozygosity for novel *AURKC* mutations in an infertile man with macrozoospermia // *Andrologia*. 2020. V. 52. № 9.
89. Hua J., Wan Y. Y. Whole-exome sequencing identified a novel mutation of *AURKC* in a Chinese family with macrozoospermia // *J. Assisted Reproduction and Genet*. 2019. V. 36. № 3. P. 529–534.
90. Kimmins S., Crosio C., Kotaja N. et al. Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis // *Mol. Endocrinology*. 2007. V. 21. № 3. P. 726–739.
91. Kherraf Z.E., Cazin C., Lestrade F. et al. From azoospermia to macrozoospermia, a phenotypic continuum due to mutations in the *ZMYND15* gene // *Asian J. Andrology*. 2022. V. 24. № 3. P. 243–247.
92. Yan W., Si Y., Slaymaker S. et al. *Zmynd15* encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility // *The J. Biol. Chemistry*. 2010. V. 285. № 41. P. 31418–31426.
93. Kierszenbaum A. L., Rivkin E., Tres L. L. Molecular biology of sperm head shaping // *Society Reproduction and Fertility Supplement*. 2007. V. 65. P. 33–43.
94. Osadchuk L., Shantanova L., Troev I. et al. Regional and ethnic differences in semen quality and reproductive hormones in Russia: A Siberian population-based cohort study of young men // *Andrology*. 2021. V. 9. № 5. P. 1512–1525.
95. Kleshchev M., Osadchuk A., Osadchuk L. Impaired semen quality, an increase of sperm morphological defects and DNA fragmentation associated with environmental pollution in urban population of young men from Western Siberia, Russia // *PLoS One*. 2021. V. 16. № 10.
96. Kolmykov S., Vasiliev G., Osadchuk L. et al. Whole-exome sequencing analysis of human semen quality in Russian multiethnic population // *Frontiers in Genet*. 2021. V. 12.



## Genetic Variants Causing Teratozoospermia in Humans

M. A. Kleshchev<sup>1, \*</sup>, A. V. Osadchuk<sup>1</sup>, L. V. Osadchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch  
of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*e-mail: max82c11@bionet.nsc.ru*

It is known that pathogenic variants of genes controlling spermiogenesis can lead to the monomorphic teratozoospermia, which is characterized by the predominance of morphological abnormalities of any one type – globozoospermia, macrozoospermia, sperm acephaly, multiple abnormalities of the sperm flagellum, as well as polymorphic teratozoospermia, when several types of sperm abnormalities occur in the ejaculate. The information obtained as a result of systematization and analysis of information on pathogenic gene variants associated with impaired sperm morphology may be useful for understanding the molecular mechanisms of teratozoospermia. The evidences from 134 literature sources and the databases Malacards, OMIM, KEGG, CTD, DisGeNET were obtained. The information on 109 human genes pathogenic variants of which are associated with the teratozoospermia (globozoospermia, multiple flagellum abnormalities syndrome, dysplasia of the fibrous membrane of the flagellum of spermatozoa, acephaly, macrozoospermia, polymorphic teratozoospermia) was systematized. It was revealed that each type of teratozoospermia is caused by a violation of specific biological processes. However, pathogenic gene variants controlling the processes associated with the organization and functioning of the cytoskeleton and intracellular transport make the greatest contribution genetically determined teratozoospermia.

**Keywords:** spermiogenesis, sperm morphology, infertility, teratozoospermia, morphological defects of spermatozoa.

УДК 575.113

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ *TLEWI* ВИДА *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)<sup>1</sup>

© 2024 г. М. В. Пузаков<sup>1</sup> \*, Л. В. Пузакова<sup>1</sup>, Ю. Н. Улупова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей  
им. А.О. Ковалевского» Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

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

Поступила в редакцию 29.03.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 25.06.2024 г.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) обнаруживаются в геномах практически всех эукариот. Они имеют характерное строение, обеспечивающее их транспозиционную активность, в результате которой МГЭ могут вносить изменения в структуру и функционирование генома. В ходе коэволюции с геномом последовательности МГЭ могут быть одомашнены. Под «молекулярным одомашниванием» подразумевают кооптацию последовательности МГЭ, в результате которой она начинает выполнять полезную функцию в геноме хозяина. У двустворчатых моллюсков были выявлены ДНК-транспозоны подсемейства *TLEWI*, которые обладают признаками одомашнивания, а также сплайсосомными интронами, что делает их похожими на гены эукариот. Для проверки гипотезы одомашнивания в данной работе был проведен внутривидовой анализ присутствия *TLEWI*-транспозонов у тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) и их транскрипционной активности в различных тканях, в ходе онтогенеза и при воздействии внутренних и внешних факторов. В результате была выявлена внутривидовая гетерогенность по наличию потенциально функциональных копий и экспрессии генов транспозазы. Так, для двух элементов выявлена зависимость транскрипционной активности от стадий онтогенеза, а также от температуры. В связи с этим предполагается, что функциональные (возможно, одомашненные) аллели сохранились в отдельных популяциях тихоокеанской устрицы. Накопление дополнительных данных позволит обнаружить популяции, которые сохраняют активные гены транспозазы *TLEWI*, а также определить, были ли эти гены одомашнены геномом.

**Ключевые слова:** мобильные генетические элементы, ДНК-транспозоны, *TLEWI*, тихоокеанская устрица, *Crassostrea gigas*, молекулярное одомашнивание, генетическое разнообразие.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110026 **EDN:** WBQMJM

За последние десятилетия были прочитаны последовательности геномной ДНК нескольких десятков тысяч видов эукариот. Мобильные генетические элементы (МГЭ) были обнаружены в каждом секвенированном геноме. МГЭ – последовательности ДНК, имеющие характерную структуру, которая может включать прямые или инвертированные повторы, кодирующие и регуляторные последовательности. Структурные особенности МГЭ позволяют им перемещаться из локуса в локус в пределах одного и того же генома (клетки) [1, 2]. В зависимости от механизма транспозиции МГЭ эукариот делят на классы – ретротранспозоны и

ДНК-транспозоны, каждый класс подразделяется на подклассы, надсемейства, семейства и т.д. [2, 3]. Некоторые МГЭ (например, эндогенные ретровирусы) имеют в своей структуре последовательности, позволяющие перемещаться из клетки в клетку [2]. Кроме того, известны случаи горизонтального переноса МГЭ между организмами [4].

Способность МГЭ к перемещениям определяет ряд их биологических функций. Так, МГЭ являются одним из основных факторов эволюции, поскольку служат постоянным источником изменчивости. Они могут вызывать как небольшие нуклеотидные изменения (короткие инсерции), так и протяженные хромосомные перестройки [1, 2]. Инсерции МГЭ подвергаются естественному отбору: мутации, влекущие снижение приспособленности

<sup>1</sup>Дополнительные материалы размещены в электронном виде по doi статьи.

хозяина, будут исчезать из популяции, в то время как нейтральные могут сохраняться, а полезные мутации даже закрепляться [5–7]. Также на МГЭ влияют и другие эволюционные процессы, например, генетический дрейф, в результате которого доля инсерционных мутаций может снижаться вплоть до полного исчезновения или возрастая и закрепляться в популяции. Параллельно с вовлеченностью в эволюционные процессы, связанные с хозяином, МГЭ амплифицируются и эволюционируют также внутри генома хозяина. Существует конкуренция между МГЭ – элементы, способные производить много копий, имеют больше шансов колонизировать геном и популяцию, чем те, активность которых снижена. В результате взаимодействия МГЭ и генома возникли сложные механизмы регуляции активности элементов [8]. Кроме того, известно явление молекулярного одомашнивания, в результате которого компоненты МГЭ могут стать функциональной единицей генома [8, 9].

МГЭ, прошедшие молекулярное одомашнивание, как правило, теряют вспомогательные структуры (прямые и инвертированные повторы). Кооптированные гены присутствуют в геноме в виде единственной копии (фрагмента). Ортологи таких генов могут быть обнаружены у нескольких видов [10]. На данный момент описано достаточно много генов, которые являются производными МГЭ, хотя функции многих из них остаются неясны [11]. Например, гены *Rag1* и *Rag2* (потомки ДНК-транспозонов), являются ключевыми компонентами специфического иммунитета и катализируют рекомбинацию V(D)J [12, 13]. Ген *SETMAR* приматов кодирует химерный белок (каталитический домен заимствован у транспозазы МГЭ *mariner*), участвующий в механизмах репарации ДНК, включая негомологическое соединение концов и восстановление двухцепочечных разрывов [14]. Также известна конвергентная кооптация *pogo*-подобных транспозаз, в результате которой организмы получили специфические центромера-связывающие факторы [15].

К-транспозоны подсемейства *TLEWI* (входящие в группу *IS630/Tc1/mariner*) были выявлены у двустворчатых моллюсков [16]. Эти МГЭ имели одиночные полноразмерные копии, утратили концевые инвертированные повторы (КИП) и содержали сплайсосомные интроны в кодирующей транспозазу последовательности. Для некоторых *TLEWI*-транспозонов были выявлены транскрибируемые последовательности РНК, в которых интронные области были удалены. Это может указывать на возможную функциональность гена. С учетом особенностей представителей *TLEWI* было высказано предположение относительно возможного их одомашнивания геномами моллюсков [16].

В настоящем исследовании мы предприняли попытку выяснить, являются ли гены

*TLEWI*-транспозаз одомашненными. В ходе работы мы провели сравнение представителей *TLEWI*-транспозонов в пяти сборках геномной ДНК разных особей тихоокеанской устрицы *Crasostrea (Magallana) gigas* (Thunberg, 1793). Также мы провели анализ дифференциальной экспрессии генов *TLEWI* с целью установить возможную зависимость от стадий развития, типа тканей и внешних воздействий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Поиск и анализ последовательностей *TLEWI*-транспозонов

Поиск ДНК-транспозонов подсемейства *TLEWI* осуществлялся с помощью BLAST [17]. В качестве шаблона использовались кодирующие транспозазу последовательности элементов *TLEWI-1\_CGi*, *TLEWI-2\_CGi*, *TLEWI-3\_CGi*, *TLEWI-4\_CGi*, *TLEWI-5\_CGi*, которые были описаны ранее [16]. Сборки нуклеотидных последовательностей геномной ДНК устрицы *C. gigas* были взяты в коллекциях NCBI WGS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для удобства они были обозначены CGi(I), CGi(II), CGi(III), CGi(IV) и CGi(V) (табл. 1). Для определения границ полноразмерных (репрезентативных) элементов гомологии с наилучшим сходством к шаблону извлекались вместе с фланкирующими последовательность участками протяженностью 3000 п. н. КИП выявляли с помощью BLASTn [17]. Границы открытой рамки считывания (ОРС) и экзонов определялись визуально, исходя из наибольшей гомологии с шаблоном и наличием специфичных сайтов сплайсинга GT/AG. Количество копий *TLEWI*-транспозонов определяли подсчетом выявленных в геномных сборках гомологов репрезентативной копии с использованием BLASTn [17]. При подсчете копий учитывались последовательности длиной не менее 300 п. н. Копии, соразмерные репрезентативным элементам и содержащие соответствующее шаблону число экзонов, считали полноразмерными.

### Филогенетический анализ

В филогенетический анализ были включены аминокислотные последовательности всех описанных элементов *TLEWI* тихоокеанской устрицы (табл. 2), а также представителей семейств *Tc1* и *Mosquito*. Множественное выравнивание было выполнено с помощью MAFFT с применением метода G-INS-I [18]. Филогенетическое дерево было создано с использованием метода максимально правдоподобия в программе IQ-TREE [19] со сверхбыстрым бутстреп-анализом (UFBoot) – 1000 повторов [20], а модель VT+F+I+G4 была выбрана с помощью ModelFinder [21].

**Таблица 1.** Геномные сборки тихоокеанской устрицы *C. gigas*, использованные в анализе

№ п/п	Идентификатор	Дата публикации	Линия	Уровень сборки / геномный охват	Размер генома / количество компонентов	Scaffold N50
CGi(I)	GCA_902806645	19.02.2020	F23_Roslin	Chromosome / 70.0x	647,9 млн п. н. / 236	1,6 млн п. н.
CGi(II)	GCA_011032805	27.02.2020	QD	Chromosome / 196.0x	586,9 млн п. н. / 10	61,0 млн п. н.
CGi(III)	GCA_025765685	20.10.2022	CH1-GI (China: Qingdao)	Chromosome / 70.0x	606,4 млн п. н. / 88	60,5 млн п. н.
CGi(IV)	GCA_005518195	16.12.2019	BH1A (China: The Bohai Sea)	Contig / 85.6x	587,5 млн п. н. / 3676	581,9 т. п. н.
CGi(V)	GCA_000297895	08.08.2019	05x7-T-G4-1.051#20	Scaffold / 196.0x	564,8 млн п. н. / 7655	286,9 т. п. н.

#### Анализ транскрипционной активности

Оценка дифференциальной экспрессии генов, кодирующих транспозазу, была выполнена с помощью совместного использования программ Kallisto (v0.46.1) и Sleuth (v0.30.0) [22]. Реализованный в Kallisto метод псевдовывравнивания архивов коротких нуклеотидных последовательностей (SRA) и полноразмерных транскриптов позволяет подсчитывать количество содержания РНК конкретного гена в образце, которое выражается в величине TPM (транскриптов на миллион п. н.). Далее с помощью Sleuth на основе предварительных количественных оценок, полученных с помощью Kallisto, создается нормализованная на уровне генов матрица TPM. В качестве референсных транскриптов использовался набор полноразмерных транскрибированных последовательностей устрицы GIUV00000000.1 из GenBank. В качестве материала для исследования были использованы SRA транскриптомов, размещенных в свободном доступе в коллекциях NCBI. Полный список проектов, в рамках которых проводилось секвенирование транскриптомных последовательностей, представлен в дополнительных материалах (Доп. мат. 1).

Из полученных результатов извлекались данные дифференциальной экспрессии генов пяти элементов *TLEWI*. Кроме того, в качестве контроля транскрипционной активности в образцах в анализ были взяты гены домашнего хозяйства *mdh1* (кодирует цитоплазматическую малатдегидрогеназу), *hprt1* (кодирует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу), *tubb* (кодирует цитоскелетный белок тубулин) и *gfi2e1* (кодирует субъединицу общего фактора транскрипции ПЕ).

Данные визуализировались в виде тепловых карт. SRA группировали в зависимости от факторов воздействия на образцы, стадий онтогенеза устрицы и типа тканей. По интенсивности окрашивания ячеек проводился сравнительный анализ уровня транскрипционной активности. Были введены семь визуально различимых категорий: отсутствие (нет), очень слабый (о/сл), слабый (сл), средне-слабый (ср/сл), средний (ср), средне-сильный (ср/сил) и сильный (сил). Для описания динамики экспрессии были введены следующие категории: с зависимостью от условий (СЗ – экспрессия гена присутствует практически во всех точках и наблюдается очевидная тенденция изменения уровня активности), постоянная без зависимости от условий (ПБЗ – экспрессия гена присутствует практически во всех точках, но нет очевидного изменения уровня активности) и мозаичная (М – экспрессия гена проявляется случайным образом).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Представленность транспозонов *TLEWI* в геноме пяти особей тихоокеанской устрицы

Для выявления ДНК-транспозонов *TLEWI* в сборках геномных последовательностей *Crassostrea gigas* в качестве образца были использованы кодирующие последовательности *TLEWI-1\_CGi*, *TLEWI-2\_CGi*, *TLEWI-3\_CGi*, *TLEWI-4\_CGi*, *TLEWI-5\_CGi*. Было изучено пять сборок, которые на момент исследования были представлены в базе NCBI (см. табл. 1). Характеристики полноразмерных или наиболее протяженных копий транспозонов *TLEWI*, полученные в результате исследования,

**Таблица 2.** Полноразмерные и репрезентативные копии транспозонов *TLEWI*, описанные у тихоокеанской устрицы *S. gigas*

Транспозон	Копия	Длина, пн	КИП, пн	Транспозаза, а. о.	Паттерн каталитического домена	Количество копий*
<i>TLEWI-1_CGi</i>	<i>TLEWI-1.1_CGi(I)</i>	3790	—	347	D87G36E	12(2)
	<i>TLEWI-1.2_CGi(I)</i>	3178	—	351	D87D36E	
	<i>TLEWI-1.1_CGi(II)</i>	3097	30	351	D87G36E	7(3)
	<i>TLEWI-1.2_CGi(II)</i>	2751	30	347	D87D35E	
	<i>TLEWI-1.3_CGi(II)</i>	2716	30	347	D87D35E	
	<i>TLEWI-1.1_CGi(III)</i>	2719	30	347	D87D35E	5(2)
	<i>TLEWI-1.2_CGi(III)</i>	3086	30	347	D87D36E	
	<i>TLEWI-1.1_CGi(IV)</i>	3014	—	355	D94D36E	6(2)
	<i>TLEWI-1.2_CGi(IV)</i>	7120	—	391	D87D36E	
	<i>TLEWI-1.1_CGi(V)</i>	2720	—	356	D87D36E	9(2)
	<i>TLEWI-1.2_CGi(V)</i>	2312	—	356	D87D36E	
<i>TLEWI-2_CGi</i>	<i>TLEWI-2.1_CGi(I)</i>	2534	—	353	D87D36E	1(1)
	<i>TLEWI-2.1_CGi(II)</i>	1575	—	353	D87D36E	4(3)
	<i>TLEWI-2.2_CGi(II)</i>	1580	—	353	D87D36E	
	<i>TLEWI-2.3_CGi(II)</i>	1580	—	353	D87D36E	
	<i>TLEWI-2.1_CGi(III)</i>	1580	—	353	D87D36E	2(1)
	<i>TLEWI-2.1_CGi(IV)</i>	2540	—	351	D85D35E	2(1)
	<i>TLEWI-2.1_CGi(V)</i>	1579	—	352	D87D36E	1(1)
<i>TLEWI-3_CGi</i>	<i>TLEWI-3.1_CGi(I)</i>	4047	—	343	D89N36E	3(1)
	<i>TLEWI-3.1_CGi(II)</i>	20759	—	378	D89D36E	2(1)
	<i>TLEWI-3.1_CGi(III)</i>	2476	25	343	D89D36E	2(1)
	<i>TLEWI-3.1_CGi(IV)</i>	1610	25	232	D?	1(0)
	<i>TLEWI-3.1_CGi(V)</i>	6947	—	416	D89D36E	3(1)
<i>TLEWI-4_CGi</i>	<i>TLEWI-4.1_CGi(I)</i>	1825	—	275	?D36E	1(0)
	<i>TLEWI-4.1_CGi(II)</i>	1518	—	272	D87D?	1(0)
	<i>TLEWI-4.1_CGi(III)</i>	6148	—	278	S117D36E	4(0)
	<i>TLEWI-4.1_CGi(VI)</i>	1730	—	338	D87D36E	3(1)
	<i>TLEWI-4.1_CGi(V)</i>	1521	—	274	D87D?	2(0)
<i>TLEWI-5_CGi</i>	<i>TLEWI-5.1_CGi(IV)</i>	1454	—	251	D??	1(0)
	<i>TLEWI-5.1_CGi(V)</i>	2006	—	351	D87D36E	1(1)

Примечание. Полу жирным курсивом выделены элементы, имеющие потенциально-функциональный ген транспозазы; \* — в скобках указано количество полноразмерных копий.



были объединены в табл. 2. Для обозначения принадлежности копии к конкретной сборке после названия элемента в скобках указывали номер сборки. Для обозначения описываемой копии внутри сборки после номера элемента через точку добавляли номер копии. Например, обозначение *TLEWI-1.2\_CGi(IV)* означает «вторая копия элемента *TLEWI-1\_CGi* в полногеномной сборке *CGi(IV)*».

В пяти исследованных сборках устрицы было выявлено от 5 до 12 копий транспозона *TLEWI-1\_CGi*, среди которых было 11 полноразмерных (см. табл. 2). В сборках *CGi(I)*, *CGi(III)*, *CGi(IV)*, *CGi(V)* обнаружено по две полноразмерных копии, тогда как в *CGi(II)* найдено три. Выявленные элементы имели длину от 2716 до 3790 п. н., кроме элемента *TLEWI-1.2\_CGi(IV)*, длина которого составила 7120 п. н. Длина *TLEWI-1\_CGi*, описанного ранее [16], была 3749 п. н. Размер транспозазы у большинства копий варьировал от 347 до 355 а. о. Исключение составил *TLEWI-1.2\_CGi(IV)*, у которого длина транспозазы была несколько больше (391 а. о.). Увеличение протяженности *TLEWI-1.2\_CGi(IV)* явилось результатом вставки и в один из интронов, и в кодирующую последовательность. У большинства копий *TLEWI-1\_CGi* были выявлены сдвиги в открытой рамке считывания (ОРС). В ОРС копий *TLEWI-1.2\_CGi(II)*, *TLEWI-1.3\_CGi(II)*, *TLEWI-1.1\_CGi(III)* в четвертом экзоне наблюдается нарушение последовательности, в результате которого в области второго маркерного остатка (аспарат, D) каталитического домена был потерян серин (DNDSKH). Копии *TLEWI-1.1\_CGi(I)* и *TLEWI-1.2\_CGi(III)* имеют визуально неповрежденную ОРС и могут быть функциональными. У копий *TLEWI-1.1\_CGi(II)*, *TLEWI-1.2\_CGi(II)*, *TLEWI-1.3\_CGi(II)*, *TLEWI-1.1\_CGi(III)*, *TLEWI-1.2\_CGi(III)* был обнаружен один концевой инвертированный повтор, что было показано и для *TLEWI-1\_CGi*, описанного ранее [16].

В результате поиска транспозона *TLEWI-2\_CGi* было выявлено семь полноразмерных копий. В сборках *CGi(I)*, *CGi(III)*, *CGi(IV)*, *CGi(V)* было обнаружено по одной такой копии, в *CGi(II)* — три копии. Длина последовательностей варьировала от 1575 до 2540 п. н. при референсном значении — 2160 п. н. [16]. Ни у одной из копий КИП обнаружены не были. Длина транспозазы была от 351 до 353 а. о. У трех копий (*TLEWI-2.1\_CGi(I)*, *TLEWI-2.1\_CGi(IV)*, *TLEWI-2.1\_CGi(V)*) кодирующая последовательность имела повреждения (стоп-кодона, сдвиги и разрывы). У остальных копий транспозазы визуально интактная и, возможно, функциональная (см. табл. 2). Копия *TLEWI-2.1\_CGi(IV)* имела сдвиг рамки считывания, в результате которого количество аминокислотных остатков между вторым маркерным остатком (аспарат, D) и третьим (глутамат, E) составило 35. Общее количество копий

транспозона *TLEWI-2\_CGi* в пяти сборках варьировало от 1 до 4.

В четырех сборках было выявлено по одной полноразмерной копии транспозона *TLEWI-3\_CGi*. Не имела полноразмерного варианта только сборка *CGi(IV)*. Полноразмерные копии имели существенные различия по протяженности. *TLEWI-3.1\_CGi(III)* (2476 п. н.) была значительно короче референсной последовательности *TLEWI-3\_CGi*, описанной ранее (5498 п. н.) [16]. Копия *TLEWI-3.1\_CGi(I)* имела длину 4047 п. н. У *TLEWI-3.1\_CGi(II)* и *TLEWI-3.1\_CGi(V)* длина транспозона была увеличена вследствие вставок в некодирующие части (интроны) и составила 6947 и 20759 п. н. соответственно. Размеры транспозазы составили 232–416 а. о. Только две копии (*TLEWI-3.1\_CGi(II)*, *TLEWI-3.1\_CGi(III)*) имели визуально неповрежденную транспозазу, что предполагает сохранение функциональности. У *TLEWI-3.1\_CGi(III)* и *TLEWI-3.1\_CGi(IV)* было выявлено по одному концевому инвертированному повтору. Классический каталитический домен был сохранен у трех копий — *TLEWI-3.1\_CGi(II)*, *TLEWI-3.1\_CGi(III)*, *TLEWI-3.1\_CGi(V)*. У двух других — *TLEWI-3.1\_CGi(I)* и *TLEWI-3.1\_CGi(IV)*, имелись видимые отличия, а именно — у *TLEWI-3.1\_CGi(I)* второй аспарат (D) был замещен на аспарагин (N), а у *TLEWI-3.1\_CGi(IV)* сохранился только первый аспарат (D), при этом области второго и третьего маркерных оснований были утрачены. Общее количество копий транспозона *TLEWI-3\_CGi* варьировало от 1 до 3 (см. табл. 2).

При поиске копий транспозона *TLEWI-4\_CGi* единственная полноразмерная копия была обнаружена в сборке *CGi(IV)* (см. табл. 2). Длина *TLEWI-4\_CGi* по данным предыдущего исследования [16] составляла 2849 пн. Однако, у копии *TLEWI-4.1\_CGi(IV)* протяженность была всего 1730 п. н. вследствие укороченных интронов. Длина транспозазы составляла 338 а. о. Копии в других сборках имели существенные делеции. Ни одна из копий не имела КИП. Несмотря на то, что копия *TLEWI-4.1\_CGi(IV)* полноразмерная, она имеет разрывы кодирующей последовательности и внутренние стоп-кодона и, по всей видимости, не функциональна. В целом в сборках элемент *TLEWI-4\_CGi* был представлен в количестве от 1 до 4 копий (см. табл. 2).

В пяти исследованных сборках устрицы было выявлено только две копии транспозона *TLEWI-5\_CGi* (в сборках *CGi(IV)* и *CGi(V)*), среди которых лишь один полноразмерный вариант (*TLEWI-5\_CGi(V)*) (см. табл. 2). В сборках *CGi(I)*, *CGi(II)*, *CGi(III)* копий *TLEWI-5\_CGi* не выявлено. Протяженность *TLEWI-5\_CGi(V)* составляла 2006 п. н. Ни у одной копии КИП не были обнаружены. Транспозазы *TLEWI-5.1\_CGi(V)* (длина 351 а. о.) не имела явных повреждений и, по-видимому, может

быть функциональной. В каталитическом домене *TLEWI-5.1\_CGi(IV)* был утерян фрагмент, содержащий второй (D) и третий (E) маркерный остаток.

Таким образом, мы наблюдаем очевидную вариативность по количеству и качеству копий транспозонов *TLEWI* у пяти особей устрицы. Несмотря на то, что многие копии имеют делеции и нарушения кодирующей последовательности, сохраняются и визуально неповрежденные варианты. Четыре элемента, как минимум в одной из сборок, сохранили потенциально-функциональный ген транспозазы. Исключением является *TLEWI-4\_CGi*, для которого не было выявлено ни одной потенциально-функциональной копии. На выявленные различия в представленности транспозонов *TLEWI* у разных особей устрицы, несомненно, влияет качество секвенирования и сборки геномной ДНК. В результате неполного секвенирования и недостаточно качественной сборки можно получить ложноотрицательные результаты. Однако каждая из пяти сборок имеет удовлетворительные характеристики. Также и полученные в ходе исследования результаты (наличие элементов, количество копий) не дают оснований предполагать, что какая-то из сборок имеет более низкое качество.

#### *Эволюционное разнообразие транспозонов TLEWI тихоокеанской устрицы*

В филогенетический анализ были включены аминокислотные последовательности, кодируемые OPC всех копий, приведенных в табл. 2. В качестве внешней группы были взяты транспозазы элементов семейства *Tc1* и *Mosquito* (рис. 1). Все копии элементов *TLEWI* сформировали единую кладу с бутстреп-поддержкой 100%. Транспозоны внутри клады с высокой достоверностью (от 75 до 100%) расположились в том же порядке, как и в предыдущем исследовании [16]. Согласно полученной эволюционной модели, *TLEWI-5\_CGi* является более рано дивергировавшим вариантом. Затем ответвляется *TLEWI-3\_CGi*, после него – *TLEWI-1\_CGi*, и наибольшее сходство продемонстрировали *TLEWI-2\_CGi* и *TLEWI-4\_CGi* (см. рис. 1). Копии транспозона *TLEWI-1\_CGi* сформировали два кластера, в каждом из которых присутствуют копии из всех пяти исследованных особей, что может свидетельствовать о формировании двух независимых линий транспозонов, эволюция которых началась до обособления вида *C. gigas*.

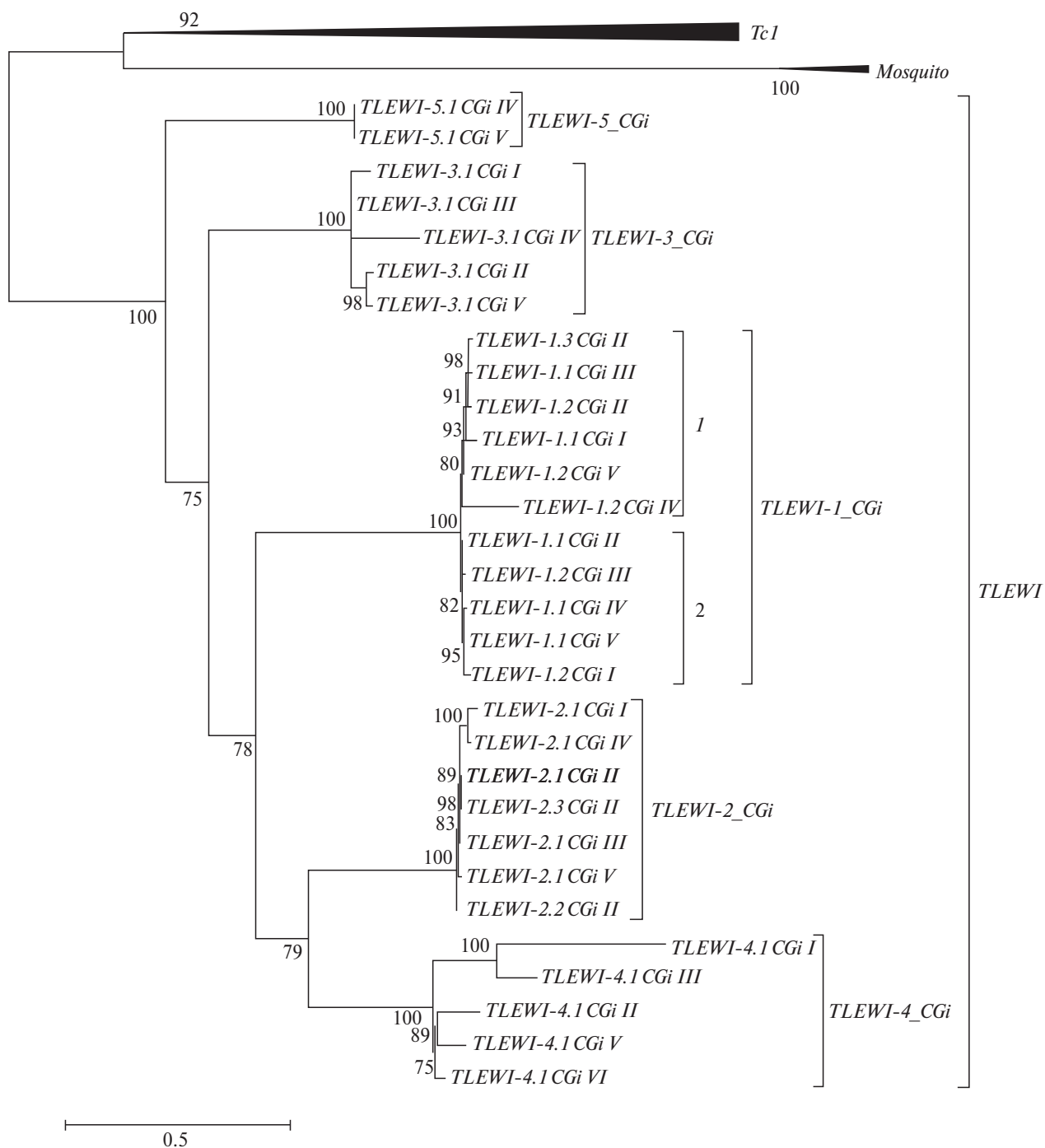
#### *Транскрипционная активность гена транспозазы элементов TLEWI*

Оценка дифференциальной экспрессии гена транспозазы элементов *TLEWI* была проведена с использованием SRA – транскриптомов, полученных из различных тканей устрицы, из особей на разных стадиях развития и из особей, подвергнутых

воздействию различных факторов, извлеченных из коллекций NCBI (табл. 3, Доп. мат. 1). В анализ транскрипционной активности был взят ген транспозазы всех пяти транспозонов *TLEWI*. В предыдущем исследовании были найдены потенциально-функциональные копии гена транспозазы и его полноразмерные транскрипты только для элементов *TLEWI-1\_CGi*, *TLEWI-2\_CGi* и *TLEWI-3\_CGi* [16]. В настоящем исследовании в одной из сборок мы обнаружили копию *TLEWI-5\_CGi* без очевидных нарушений, поэтому взяли ген этого элемента в анализ.

Несмотря на то, что не было обнаружено неповрежденных последовательностей *TLEWI-4\_CGi*, ген транспозазы *TLEWI-4\_CGi* также был включен в анализ, поскольку мы допустили, что у особей, материал которых был использован в анализе транскриптомов, может присутствовать потенциально-функциональный вариант. В качестве контроля качества образцов были взяты гены *gff2e1* (кодирует субъединицу общего фактора транскрипции ПЕ), *mdh1* (кодирует фермент энергетического обмена цитоплазматическую малатдегидрогеназу), *hprt1* (кодирует фермент пуринового обмена гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу) и *tubb* (кодирует цитоскелетный белок тубулин). В результате анализа данных не было выявлено транскрипции контрольных генов в группах PRJNA154615.1 и PRJNA154615.2 (см. табл. 3), хотя в некоторых тканях наблюдалась активность генов транспозонов. В гонадах выявлена транскрипция гена транспозазы *TLEWI-1\_CGi*, *TLEWI-3\_CGi* и *TLEWI-4\_CGi*. В пищеварительной железе отмечается активность *TLEWI-2\_CGi*, *TLEWI-3\_CGi* и *TLEWI-4\_CGi*, в мантии – *TLEWI-2\_CGi* и *TLEWI-4\_CGi*, а в мышце – *TLEWI-1\_CGi* (см. табл. 3).

В ходе исследования была выявлена зависимость уровня транскрипционной активности гена транспозазы *TLEWI-1\_CGi* от стадий онтогенеза устрицы (см. табл. 3, рис. 2). Выявлена динамика экспрессии от средне-слабого уровня на стадии яйца с повышением до среднего уровня (со стадии двухклеточного эмбриона до поздней умбо-1) и последующим ослаблением до полного выключения на стадии педивелигер 2. Единичный случай отсутствия транскрипции на стадии ранней морулы мы рассматриваем как артефакт. Также наблюдается зависимость экспрессии в жабрах от температуры: при 5°C слабый уровень, к 15°C нарастает до среднего, затем снижается, и при 25°C транскрипция уже не выявляется (см. табл. 3, рис. 3). Кроме того, выявлена транскрипционная активность различной интенсивности (без очевидной зависимости) при изменении условий содержания (изменение солености воды и сочетанное воздействие голода и обезвоживания), а также при механическом воздействии (повреждение раковины). В остальных случаях экспрессия мозаичная.



**Рис. 1.** Филогенетическое разнообразие транспозонов *TLEWI* тихоокеанской устрицы. Бутстреп-значения менее 50% на дендрограмме не указаны. В анализе использовались 38 аминокислотных последовательностей, протяженность выравнивания 493 а. о.

Ген транспозазы элемента *TLEWI-2\_CGi* также продемонстрировал зависимость уровня транскрипции от температуры (см. табл. 3, рис. 3). Наблюдается повышение от средне-слабого (5°C) к среднему уровню (10 и 15°C) и последующее снижение к средне-слабому и слабому при 20 и 25°C

соответственно. Кроме того, выявлена динамика экспрессии при изменении солености воды (см. табл. 3, рис. 4). При 5‰ уровень транскрипции слабый. После повышения содержания соли до 10‰ происходит повышения уровня транскрипции до среднего. При дальнейшем повышении



**Таблица 3.** Транскрипционная активность генов транспозазы элементов *TLEWI* в различных тканях в ходе онтогенеза и при воздействии стрессирующих факторов

Условия	Элементы				
	<i>TLEWI-1_CGi</i>	<i>TLEWI-2_CGi</i>	<i>TLEWI-3_CGi</i>	<i>TLEWI-4_CGi</i>	<i>TLEWI-5_CGi</i>
Воздух и голод, жабры PRJNA146329.7	М (сл–ср)	М (оч/сл–ср)	М (сл–ср)	Нет (одно исключение– сл)	М (оч/сл–ср)
Воздух и голод, мышцы PRJNA146329.7	ПБЗ (оч/сл–ср/ сил)		ЗУ (ср–ср/сл–оч/ сл)	М (оч/сл–сл)	
Соленость, жабры PRJNA146329.8	М (сл–ср/сил)	ЗУ (оч/сл–ср–выкл)	М (ср/сл–ср)	М (оч/сл–ср/сл)	М (оч/сл–сил)
Соленость, жабры PRJNA167099	ПБЗ (ср–ср/сил)	М (сл)	Нет	Нет	М (сл)
Температура, жабры PRJNA146329.9	ЗУ (сл–ср–выкл)	ЗУ (сл–ср–сл)	М (ср/сл–ср/сил)	ПБЗ (оч/сл–ср/сл)	Нет (1 исключение –сл)
Температура, мантия PRJNA316154	ПБЗ (сл–ср/сил)	М (ср/сл–ср)	М (оч/сл–ср/сл)	М (оч/сл–ср/сл)	Нет
Температура, жабры PRJNA407831	М (оч/сл– ср/сл)	ПБЗ (оч/сл–ср/сл) для ВYQJ и LTX М (оч/сл–ср/сл) для ВYQX и LTJ	ПБЗ (слср/сил)	М (оч/слср/сл)	М (оч/слср/сил)
Температура + инфекция, целый организм PRJNA593309.1, PRJNA593309.2	М (оч/сл–ср)	М (оч/сл–ср/сл)	М (оч/сл–ср/сл)	Нет (одно исключение – оч/сл)	Нет (одно исключение – оч/сл)
Температура + инфекция, целый организм PRJNA593309.3					М (оч/сл–ср)
рН + температура, целый организм PRJNA298285.1	М (сл–ср/сл)	М (оч/сл–ср/сл)	ПБЗ (сл–ср)	Нет	М (оч/сл–ср/сл)
рН + температура, целый организм PRJNA298285.2 – PRJNA298285.4				М (оч/сл–сл)	
рН, целый организм PRJNA735889.1 – PRJNA735889.5	М (оч/сл–ср/ сил)	М (оч/сл–ср)	М (оч/сл–ср/сил)	М оч/сл–ср/сл)	М (оч/сл–ср/сил)

Таблица 3. Окончание

Условия	Элементы				
	<i>TLEWI-1_CGi</i>	<i>TLEWI-2_CGi</i>	<i>TLEWI-3_CGi</i>	<i>TLEWI-4_CGi</i>	<i>TLEWI-5_CGi</i>
Стадии, целый организм PRJNA146329.10	ЗУ (ср/ сл–ср–выкл)	М (оч/сл–ср/сл)	М (оч/сл–ср)	ЗУ (оч/сл–ср/ сл–выкл)	М (оч/сл–сл)
Стадии* PRJNA154615.1	М (ср–сил)	М (оч/сл–ср)	М (ср/сл)	Нет	Нет
Гемолимфа* PRJNA154615.2	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Жабры* PRJNA154615.2	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Губные щупы* PRJNA154615.2	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Мантия* PRJNA154615.2	Нет	ср/сл	Нет	сл	Нет
Приводящая мышца* PRJNA154615.2	ср/сил	Нет	Нет	сл	Нет
Пищеварительная железа* PRJNA154615.2	Нет	ср	ср/сил	Нет	Нет
Гонады (женские)* PRJNA154615.2	ср	Нет	сил	сил	Нет
Остатки* PRJNA154615.2	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет

Примечание. \* – отсутствовала экспрессия контрольных генов. М – мозаичная; ПБЗ – постоянная без зависимости; ЗУ – зависимая от условий, в скобках указаны диапазоны уровня транскрипционной активности. Уровни транскрипции: очень слабый (оч/сл), слабый (сл), средне-слабый (ср/сл), средний (ср), средне-сильный (ср/сил) и сильная (сил).

концентрации соли уровень снижается до средне-слабого и затем практически исчезает. В условиях высокой температуры в двух из четырех линиях устрицы в жабрах показана транскрипционная активность различной интенсивности (от очень слабой до средне-слабой), но без очевидной зависимости (см. табл. 3). В других экспериментах ген элемента *TLEWI-2\_CGi* транскрибировался мозаично.

Наблюдается зависимость экспрессии гена элемента *TLEWI-3\_CGi* при сочетанном воздействии голода и обезвоживания. До начала воздействия (контроль) и в первые сутки уровень транскрипции средний, затем начинает снижаться до средне-слабого и на 9–11-й день экспрессия практически прекращается (см. табл. 3, рис. 5). Экспрессия без очевидной зависимости от условий наблюдается при анализе ответа гена транспозазы на изменение температуры и комбинированное воздействие температуры и pH (см. табл. 3).

Ген транспозазы элемента *TLEWI-4\_CGi* так же, как и *TLEWI-1\_CGi*, показал динамику транскрипционной активности в ходе онтогенеза. От очень слабого уровня (яйцо) с постепенным повышением до средне-слабого (умбо 2 – поздняя умбо 1) и последующим понижением до полного отсутствия экспрессии (спат, ювенильная) (см. табл. 3, рис. 2). Также наблюдается постоянная экспрессия различной интенсивности в жабрах, но без очевидной зависимости (см. табл. 3, рис. 3). В остальных экспериментах транскрипционная активность мозаичная или отсутствует. У гена транспозазы элемента *TLEWI-5\_CGi* в большинстве случаев экспрессия мозаичная или отсутствует (см. табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Термин «молекулярное одомашнивание» подразумевает кооптацию последовательности МГЭ, которая становится необходимой для функционирования генома хозяина. Некоторые исследователи

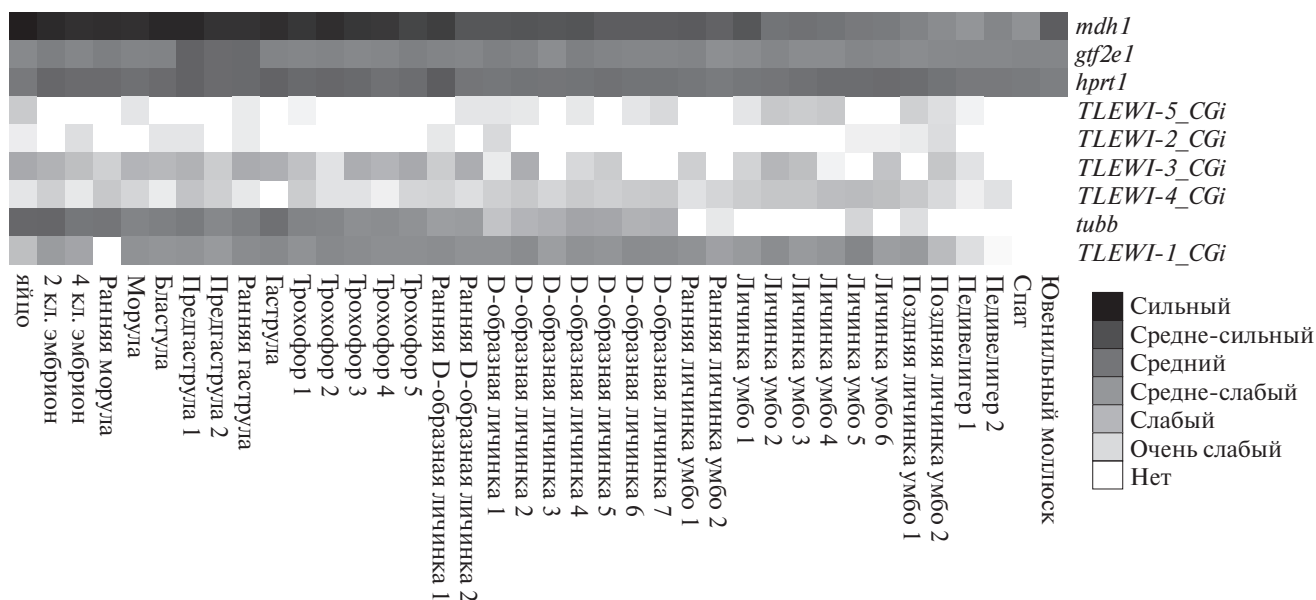


Рис. 2. Транскрипционная активность гена транспозазы элементов *TLEWI* тихоокеанской устрицы в процессе развития организма от яйца до ювенильной устрицы.

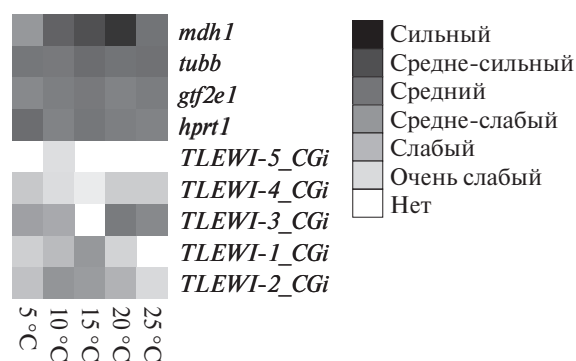


Рис. 3. Транскрипционная активность гена транспозазы элементов *TLEWI* в жабрах тихоокеанской устрицы после пребывания моллюсков в течение семи дней при различных температурных режимах.

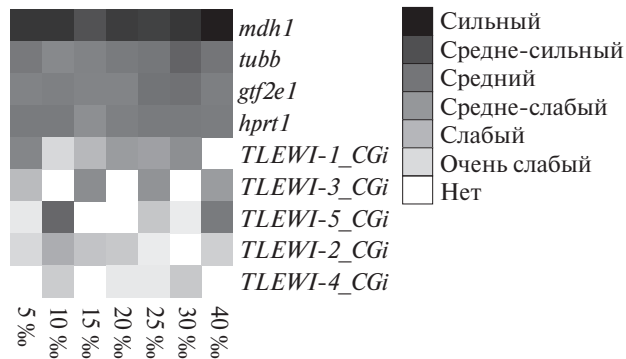
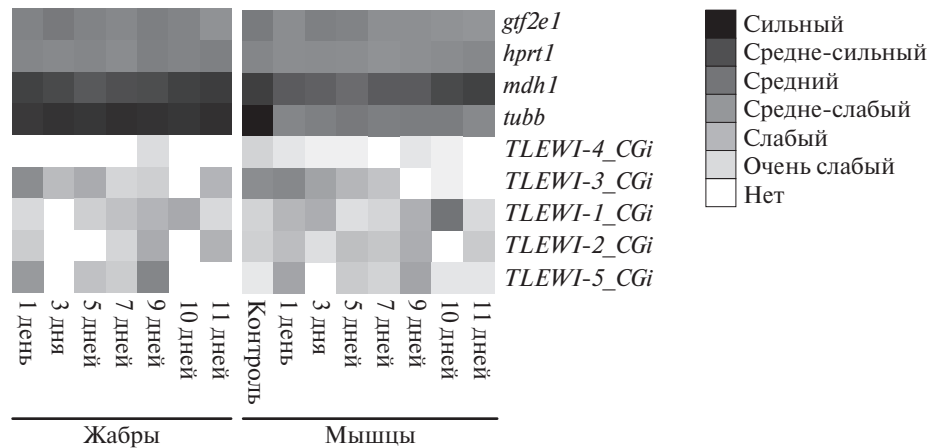


Рис. 4. Транскрипционная активность гена транспозазы элементов *TLEWI* в жабрах тихоокеанской устрицы после 12-часовой экспозиции моллюсков при различной солености.

предполагают, что молекулярное одомашнивание является итогом коэволюции МГЭ и генома [8, 9]. В результате МГЭ становится эволюционно «бессмертным», в отличие от его деградации и элиминации, которыми, как правило, обычно завершается их жизненный цикл [23, 24]. Известны случаи одомашнивания и среди транспозонов группы *IS630/Tc1/mariner* (к которым относятся *TLEWI*). Так, ген приматов *SETMAR* кодирует химерный белок, который обладает N-концевым доменом гистон-лизин-N-метилтрансферазы и C-концевым доменом морской транспозазы. Белок, кодируемый этим геном, участвует в восстановлении двухцепочечных разрывов [14]. *pogo*-подобные транспозазы у многоклеточных организмов по

меньшей мере трижды были независимо одомашнены в белки, участвующие в создании прицентромерного комплекса [15]. В связи с тем, что *TLEWI* обладают признаками одомашнивания, а также структурой, сходной с генами эукариот (наличие сплайсосомных интронов), высказывалась гипотеза, что *TLEWI* двустворчатых моллюсков были одомашнены [25]. Однако потенциально-функциональные гены были обнаружены только у двух видов, поэтому также рассматривался сценарий, в котором ген *TLEWI* был кооптирован, но затем его функция потеряла актуальность и стала необязательной (нейтральной) для хозяина. В ходе последующей эволюции функциональные аллели сохранились лишь у некоторых представителей группы



**Рис. 5.** Транскрипционная активность гена транспозазы элементов *TLEWI* в жабрах и мышцах тихоокеанской устрицы в процессе длительного пребывания без воды и пищи.

*Pteriomorpha*, тогда как нефункциональные ортологи остаются в виде псевдогенов у каждого второго представителя таксона [25].

Исследование пяти особей (сборок) тихоокеанской устрицы показало достаточно широкую вариабельность в представленности транспозонов *TLEWI* (см. табл. 2). Различия в количестве копий могут быть результатом как внутривидовой вариабельности, так и секвенирования. Тот факт, что потенциально-функциональные гены ни одного из транспозонов *TLEWI* не обнаруживаются у каждой особи, свидетельствует не в пользу гипотезы молекулярного одомашнивания. Тем не менее три транспозона имеют потенциально-функциональные гены в двух из пятиборок. Наибольшее количество таких генов выявлено в сборке CGi(III) (см. табл. 2). Транспозон *TLEWI-5\_CGi* был обнаружен только в двухбороках, что согласуется с филогенетическим анализом, согласно которому этот элемент является более древним (см. рис 1). Таким образом, представители тихоокеанской устрицы демонстрируют внутривидовую гетерогенность по количеству и качеству транспозонов *TLEWI* (см. табл. 2), что может свидетельствовать об активных эволюционных процессах.

Анализ транскрипционной активности также не дал однозначного результата. *TLEWI-5\_CGi* оказался единственным элементом, который во всех экспериментах показал случайную экспрессию (см. табл. 3). Наиболее «активным» оказался транспозон *TLEWI-1\_CGi*. Четыре из пяти транспозонов *TLEWI* в отдельных случаях демонстрировали экспрессию, зависящую от условий, а также устойчивую экспрессию без очевидной динамики. При этом в ходе анализа экспрессии в процессе онтогенеза было изучено около 40 контрольных точек, и два гена *TLEWI* продемонстрировали стадий-зависимую динамику уровня транскрипции

(см. рис 3). Мы считаем, что эти данные достаточно достоверно отображают поведение *TLEWI-1\_CGi* и *TLEWI-4\_CGi* в ходе развития устриц от яйца до взрослого организма. Также активность гена транспозазы *TLEWI* может меняться при изменении температуры и солёности и в ходе регенеративных процессов. В то же время для одного и того же элемента (например, *TLEWI-1\_CGi*) наблюдается при сравнительно идентичных условиях/тканях как стабильная экспрессия, так и ее отсутствие (мозаичная).

Мы считаем, что в результатах анализа дифференциальной экспрессии столкнулись с тем же явлением, которое наблюдали при исследовании представленности элементов в пятибороках. Очевидно, что внутривидовая гетерогенность тихоокеанских устриц является причиной противоречивых результатов и в оценке транскрипционной активности.

Известно, что индукцию транскрипционной активности МГЭ могут вызывать достаточно широкий спектр воздействий, как внутриклеточных, так и внешних. Среди них: высокие и низкие температуры, уровень pH, ультрафиолетовое излучение, магнитные поля, гамма-радиация, различные химические соединения, аутбридинг, инбридинг, инфекции, голодание и др. [26–28]. Предполагается, что активация транскрипции и транспозиции МГЭ может быть основной реакцией геномов на генетические и экологические стрессы, представляя собой, таким образом, мощный адаптивный ответ [28]. Некоторые МГЭ могут экспрессироваться на высоком уровне в эмбриональных стволовых клетках, но подавляются в ходе дифференцировки клеток [29]. Также экспрессия МГЭ неоднократно была выявлена в связи с различными патологиями, включая нейродегенеративные и возрастные заболевания, а также рак [30, 31]. В связи с этим

наличие транскрипционной активности само по себе не может быть признаком молекулярного одомашнивания. Однако характер экспрессии может позволить сделать такие предположения. Если бы во всех случаях наблюдалась мозаичная (случайная) экспрессия генов транспозаз *TLEWI*, мы бы могли утверждать, что транспозоны подсемейства *TLEWI* не были одомашнены. Однако продолжительная транскрипционная активность в ходе онтогенеза (дифференцировки клеток), на наш взгляд, может свидетельствовать об обратном. Поскольку тихоокеанская устрица является экономически значимым объектом, несомненно, что количество данных будет неуклонно расти. Анализ более широкого числа особей и прямые эксперименты позволят разрешить выявленные противоречия.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №23-26-00154, <https://rscf.ru/project/23-26-00154/>. Название проекта: «ДНК-транспозоны *IS630/Tc1/mariner* тихоокеанских устриц *Crassostrea gigas*: вклад в генетическую нестабильность и влияние на генетическое разнообразие».

Исследование одобрено Этическим комитетом Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского», (05.02.2024 г., протокол № 1).

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bourque G., Burns K. H., Gehring M. et al. Ten things you should know about transposable elements // *Genome Biology*. 2018. V. 19. № 1. P. 199. doi: 10.1186/s13059-018-1577-z
2. Kojima K.K. Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements // *Genes Genet. Syst.* 2020. V. 94. P. 233–252. DOI: 10.1266/ggs.18-00024
3. Wells J.N., Feschotte C. A field guide to eukaryotic transposable elements // *Annu. Rev. Genet.* 2020. V. 23. № 54. P. 539–561. DOI: 10.1146/annurev-genet-040620-022145
4. Wallau G.L., Ortiz M.F., Loreto E.L. Horizontal transposon transfer in eukarya: Detection, bias, and perspectives // *Genome Biol. Evol.* 2012. V. 4. № 8. P. 689–699. DOI: 10.1093/gbe/evs055
5. Casacuberta E., González J. The impact of transposable elements in environmental adaptation // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. № 6. P. 1503–1517. DOI: 10.1111/mec.12170
6. Piacentini L., Fanti L., Specchia V. et al. Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability // *Chromosoma*. 2014. V. 123. № 4. P. 345–354. DOI: 10.1007/s00412-014-0464-y
7. Auvinet J., Graça P., Belkadi L. et al. Mobilization of retrotransposons as a cause of chromosomal diversification and rapid speciation: The case for the Antarctic teleost genus *Trematomus* // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. № 1. P. 339. DOI: 10.1186/s12864-018-4714-x
8. Jangam D., Feschotte C., Betrán E. Transposable element domestication as an adaptation to evolutionary conflicts // *Trends Genet.* 2017. V. 33. № 11. P. 817–831. DOI: 10.1016/j.tig.2017.07.011
9. Bowen N.J., Jordan I.K. Exaptation of protein coding sequences from transposable elements // *Genome Dyn.* 2007. V. 3. P. 147–162. DOI: 10.1159/000107609
10. Feschotte C., Pritham E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. P. 331–368. DOI: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090448
11. Sinzelle L., Izsvák Z., Ivics Z. Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. V. 66 № 6. P. 1073–1093. DOI: 10.1007/s00018-009-8376-3
12. Kapitonov V.V., Jurka J. *RAG1* core and V(D)J recombination signal sequences were derived from *Transib* transposons // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 6. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030181
13. Panchin Y., Moroz L.L. Molluscan mobile elements similar to the vertebrate Recombination-Activating Genes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 369. № 3. P. 818–823. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.097
14. Kim H.S., Chen Q., Kim S.K. et al. The DDN catalytic motif is required for Metnase functions in non-homologous end joining (NHEJ) repair and replication restart // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 15. P. 10930–10938. DOI: 10.1074/jbc.M113.533216
15. Mateo L., González J. Pogo-like transposases have been repeatedly domesticated into *CENP-B*-related proteins // *Genome Biol. Evol.* 2014. V. 6. № 8. P. 2008–2016. DOI: 10.1093/gbe/evu153
16. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. The *Tc1*-like elements with the spliceosomal introns in mollusk genomes // *Mol. Genet. and Genomics*. 2020. V. 295. № 3. P. 621–633. DOI: 10.1007/s00438-020-01645-1
17. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs // *Nucl. Ac. Res.* 1997. V. 25. № 17. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389
18. Yamada K.D., Tomii K., Katoh K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data-reexamination of the usefulness of chained guide trees // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. № 21. P. 3246–3251. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw412
19. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies //



- Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. № 1. P. 268–274. DOI: 10.1093/molbev/msu300
20. *Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A. et al.* UF-Boot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 2. P. 518–522. DOI: 10.1093/molbev/msx281
21. *Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F. et al.* ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 6. P. 587–589. DOI: 10.1038/nmeth.4285
22. *Bray N.L., Pimentel H., Melsted P., Pachter L.* Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 5. P. 525–527. DOI: 10.1038/nbt.3519
23. *Schaack S., Gilbert C., Feschotte C.* Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution // Trends Ecol. Evol. 2010. V. 25. № 9. P. 537–546. DOI: 10.1016/j.tree.2010.06.001
24. *Blumenstiel J.P.* Birth, school, work, death, and resurrection: The life stages and dynamics of transposable element proliferation // Genes (Basel). 2019. V. 10. № 5. P. 336. DOI: 10.3390/genes10050336
25. *Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V.* An analysis of *IS630/Tc1/mariner* transposons in the genome of a Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // J. Mol. Evol. 2018. V. 86. P. 566–580. DOI: 10.1007/s00239-018-9868-2
26. *Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К.* Мобильные элементы и стресс // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. №. 1–2. С. 217–242.
27. *Юрченко Н.Н., Коваленко Л.В., Захаров И.К.* Мобильные генетические элементы: нестабильность генов и геномов // Вавил. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. №. 2. С. 261–270.
28. *Piacentini L, Fanti L, Specchia V. et al.* Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability // Chromosoma. 2014. V. 123. P. 345–354. DOI: 10.1007/s00412-014-0464-y
29. *Grow E.J., Flynn R.A., Chavez S.L. et al.* Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells // Nature. 2015. V. 522. P. 221–225. DOI: 10.1038/nature14308
30. *Grundy E.E., Diab N., Chiappinelli K.B.* Transposable element regulation and expression in cancer // FEBS J. 2022 V. 289. P. 1160–1179. DOI: 10.1111/febs.15722
31. *Schwarz R., Koch P., Wilbrandt J., Hoffmann S.* Locus-specific expression analysis of transposable elements // Brief Bioinform. 2022. V. 23. DOI: 10.1093/bib/bbab417

## Molecular Domestication of *TLEWI* DNA Transposons: Evidence and Contradictions

M. V. Puzakov<sup>1,\*</sup>, L. V Puzakova<sup>1</sup>, Y. N. Ulupova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia*

*\*e-mail: puzakov.mikh@yandex.ru*

Transposable elements (TE) are found in the genomes of almost all eukaryotes. They have a characteristic structure that ensures their transposition activity, as a result of which TE can make changes in the structure and functioning of the genome. Through coevolution with the genome, TE sequences can be domesticated. “Molecular domestication” refers to the co-optation of TE sequence, resulting in it becoming a functional part of the host genome. In bivalves, DNA transposons of the *TLEWI* subfamily have been identified, which have signs of domestication, as well as spliceosomal introns, which makes them similar to eukaryotic genes. To test the domestication hypothesis, this work carried out an intraspecific analysis of the presence of *TLEWI* transposons in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their transcriptional activity in various tissues, during ontogeny and under the influence of internal and external factors. As a result, intraspecific heterogeneity was revealed in the presence of potentially functional copies and expression of transposase genes. For example, for two elements, a dependence of transcriptional activity on the stages of ontogenesis, as well as on temperature, was revealed. This suggests that functional (possibly domesticated) alleles have been conserved in distinct populations of the Pacific oyster. The accumulation of additional data will allow us to discover populations that retain active *TLEWI* transposase genes and to determine whether these genes have been domesticated by genome.

**Keywords:** transposable elements, DNA transposons, *TLEWI*, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, molecular domestication, genetic diversity.

УДК 575.174.015.3:582.475

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, СТРУКТУРА  
И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВИДОВОГО КОМПЛЕКСА  
*Picea abies*–*Picea obovata*–*Picea koraiensis* ПО ДАННЫМ  
МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК**

© 2024 г. А. Я. Ларионова<sup>1, \*</sup>, С. А. Семерикова<sup>2</sup>, А. К. Экарт<sup>1</sup>, А. Н. Кравченко<sup>1, \*\*</sup>,  
В. Л. Семериков<sup>2</sup>, М. А. Полежаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук –  
обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, 660036 Россия

<sup>2</sup>Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук,  
Екатеринбург, 620144 Россия

\*e-mail: alya-larion@yandex.ru

\*\*e-mail: kravchenko-anna.n@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 06.06.2024 г.

В статье представлены результаты сравнительного исследования генетической структуры, параметров внутривидового генетического разнообразия и пространственной дифференциации 35 популяций елей видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis*, расположенных в пределах областей распространения «чистых» видов и в зонах контакта их ареалов. В анализ включены популяции *P. abies* из Восточной Европы (Беларусь, Польша), популяции ели из европейской части России, Урала и Западно-Сибирской равнины, расположенные в зоне интрогрессивной гибридизации *P. abies* и *P. obovata*, популяции *P. obovata* из различных частей обширного ареала этого вида в Сибири и в Монголии, а также популяции *P. koraiensis* с российского Дальнего Востока и северо-востока Китая. Изучение генетической изменчивости и дифференциации популяций проведено на основе анализа изменчивости трех микросателлитных локусов: Pt63718, Pt71936 и Pt26081, разработанных на основе хлоропластного генома *Pinus thunbergii* Parl. Использование указанных ДНК-маркеров позволило получить данные, свидетельствующие о достаточно высокой степени генетической дивергенции *P. koraiensis* от двух других входящих в комплекс видов елей *P. abies* и *P. obovata*. Произрастающая на Дальнем Востоке ель корейская существенно отличается от популяций этих видов по числу и составу гаплотипов, уровню генетического разнообразия и структуре популяций, что дает нам основание рассматривать ее в качестве отдельного вида.

**Ключевые слова:** *Picea abies*, *P. obovata*, *P. koraiensis*, cpSSR, гаплотипическое разнообразие, структура популяций, генетическая дифференциация.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110035 **EDN:** WBPQUQ

Род *Picea* A. Dietr. – ель, один из важнейших родов в семействе Pinaceae по хозяйственному значению и по обилию видов. В настоящее время представители этого рода распространены циркумполярно по всем материкам Северного полушария – от заполярных районов почти до субтропической зоны. Видовое разнообразие рода *Picea* представлено примерно 40–45 видами, ареалы большинства которых находятся в Евразии и Северной Америке [1–4].

На территории России произрастают шесть видов рода *Picea*: *Picea abies* (L.) H. Karst., *P. obovata* Ledeb., *P. jezoensis* (Siebold & Zucc.) Carrière, *P. glehnii* (F. Schmidt) Mast., *P. koraiensis* Nakai и *P. orientalis* (L.) Peterm. Самый большой и почти непрерывный ареал среди них занимают ели европейская *P. abies* и сибирская *P. obovata* [2], а обширная зона интрогрессивной гибридизации этих видов охватывает практически всю Русскую равнину до Урала и Западной Сибири [1, 2, 5]. *P. abies* распространена от Скандинавии до Урала, а также в горах



Западной Европы (Альпы, Карпаты, Балканы). В Предуралье *P. abies* постепенно замещается близким видом *P. obovata*. Ель сибирская произрастает в северо-восточной части Европейской России, практически на всей территории Сибири и на юге Дальнего Востока до побережья Охотского моря и нижнего Амура [6, 7]. В южной части Приамурья и в Приморье растет ель корейская *P. koraiensis*. Морфологическая и экологическая близость, а также наличие переходных форм вследствие возможной гибридизации [2] не позволяют установить четкой границы между *P. obovata* и *P. koraiensis* [8–11].

До настоящего времени вопрос о видовом статусе ели корейской на юге Дальнего Востока России остается открытым. Одни исследователи признают ее видовую самостоятельность [2, 6–9, 12–15], другие – рассматривают произрастающую здесь ель в качестве разновидности ели сибирской [4, 11, 16, 17]. Изучение полиморфизма морфологических признаков в популяциях ели дальневосточного региона [18], на основании которых она определялась как ель корейская, выявило значительное сходство этих популяций с популяциями ели сибирской из центральных районов ареала вида. Кроме того, было установлено, что популяции *P. koraiensis* на исследованной территории не обнаруживают характерной для самостоятельных видов определенной географической приуроченности. На основании полученных результатов авторами было высказано предположение об отсутствии *P. koraiensis* на российском Дальнем Востоке.

Кариологический анализ *P. koraiensis* и *P. obovata* выявил сходство этих видов по основным морфологическим типам хромосом. Существенные различия между кариотипами наблюдались лишь по длине хромосом, числу, частоте встречаемости и особенностям локализации нуклеолярных районов [19]. По мнению авторов, встречающиеся у *P. koraiensis* спутничные хромосомы могут быть дополнительным критерием для разграничения спорных в таксономическом плане видов *P. koraiensis* и *P. obovata*.

По данным В.В. Потенко [20], произрастающие в исследованном регионе Дальнего Востока *P. obovata* и *P. koraiensis* обнаруживают достоверно значимые различия в генетической структуре. На дендрограмме, построенной с помощью парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) на основе генетических дистанций, рассчитанных по 20 изоферментным локусам, популяции *P. obovata* и *P. koraiensis* разделяются на две группы с высоким уровнем бутстреп-поддержки. Степень генетической дифференциации популяций этих видов сопоставима с уровнем, выявляемым изоферментным методом у *P. abies* и *P. obovata*, а также у других близкородственных видов хвойных.

В естественных условиях ель корейская также растет в Северной Корее и в северо-восточных районах Китая, где ее видовой статус не вызывает сомнений у научного сообщества [21, 22]. С помощью маркеров мтДНК и хлДНК проведены исследования пяти близкородственных видов елей комплекса *P. asperata* Mast.–*P. crassifolia* Kom.–*P. meyeri* Rehder et E.H.Wilson–*P. koraiensis*–*P. obovata* [23]. Эти виды морфологически сходны, но имеют отдельные ареалы. Известно, что у хвойных вследствие разных способов передачи генетической информации (по материнской или по отцовской линии) митохондриальная и хлоропластная ДНК характеризуются разными скоростями генного потока. Хлоропластная ДНК, передаваемая через пыльцу, имеет более высокие скорости генного потока по сравнению с митохондриальной ДНК, передаваемой через семена. В ходе сравнительного исследования было обнаружено, что использованные авторами маркеры мтДНК выявляют главным образом географическую изменчивость, а маркеры хлДНК разделяют популяции в зависимости от их видовой принадлежности. Идентифицировано четыре группы популяций разных видов, дифференцированных друг от друга. Наиболее значительные различия по маркерам хлДНК наблюдались между *P. obovata* и другими видами комплекса елей, включая группу из двух видов, в которую входит *P. koraiensis*. Полученные данные свидетельствуют о том, что для разграничения видов елей лучше всего подходят маркеры хлДНК с высокой скоростью потока генов.

Исследование генетического разнообразия и популяционной структуры *P. koraiensis* на основе анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), проведенное в различных по географическому положению и климатическим условиям популяциях Китая [24], выявило достаточно высокий уровень внутривидовой дифференциации популяций этого вида. Основными причинами существенных различий между изученными в регионе популяциями *P. koraiensis*, по мнению авторов этого исследования, являются их географическая изоляция, климатическая гетерогенность и интрогрессия генов. Установлено также, что среди факторов, способствующих дифференциации популяций *P. koraiensis* из различных мест обитания, важнейшими являются температура и осадки.

Гораздо больше публикаций посвящено результатам исследования ключевых в Евразии видов *P. abies* и *P. obovata*. Достаточно подробно освещена в литературе изменчивость морфологических признаков этих видов в разных частях их ареалов [1, 5, 25, 26 и др.]. Большое внимание при этом уделяется обсуждению их таксономического статуса.

К настоящему времени на основании анализа изменчивости генетических маркеров были получены данные о разнообразии, структуре и

дифференциации популяций *P. abies* [27–43 и др.] и *P. obovata* [28, 35–40, 43–52 и др.] в различных частях ареалов этих видов. Особое внимание уделялось изучению генетической изменчивости и структуры популяций в зоне интрогрессивной гибридизации [28, 35, 38, 40, 43], в том числе на северо-западе России [53–56].

Так, при исследовании аллозимной изменчивости 26 локусов в популяциях комплекса *P. abies*–*P. obovata* [28] выявлено значительное генетическое сходство популяций этих видов. Не было обнаружено никаких фиксированных различий в аллельных частотах между ними, а также видоспецифичных диагностических локусов. На основании этого авторы предложили рассматривать *P. abies* и *P. obovata* в качестве двух подвидов или географических рас одного вида.

В дальнейших работах при использовании других молекулярных маркеров [36–38 и др.] были получены данные, указывающие на то, что *P. abies* и *P. obovata* – два разных вида, значительно дифференцированных друг от друга.

Наиболее четкое разделение видов наблюдалось при использовании маркеров мтДНК, в частности *nad1* (интрон 2), наследуемого по материнской линии. По составу гаплотипов этого фрагмента в комплексе *P. abies*–*P. obovata* выделяются три группы популяций: южноевропейская, североевропейская и сибирская [32, 37–39]. Установлено, что митохондриальные гаплотипы *P. abies* в северных популяциях группируются вместе с гаплотипами *P. obovata* и отличаются от гаплотипов *P. abies* в южных популяциях. Уровень генетической дифференциации между европейскими и сибирскими популяциями по локусу *nad1*, по данным, приведенным в публикациях, был очень высоким:  $F_{ST} = 0.650$  [39] и  $F_{ST} = 0.685$  [35]. Исследование пространственного распределения гаплотипов мтДНК и хпДНК показало, что граница, разделяющая виды, располагается вдоль р. Оби от устья на севере до водораздела Оби и Иртыша на юге [39].

Распределение хлоропластных гаплотипов на ареале видов подтверждает интрогрессивную гибридизацию между ними. Установлен факт интрогрессии *P. obovata* в северные популяции *P. abies* [32, 33, 35, 40], а общее распределение митохондриальной и ядерной изменчивости указывает на интрогрессию ядерной ДНК *P. abies* в южные популяции *P. obovata* [38].

В результате процессов интрогрессивной гибридизации *P. abies* и *P. obovata* на территории Восточно-Европейской равнины сформировалась большая группа популяций гибридного происхождения [5, 26, 53, 54, 56, 57]. При анализе изменчивости ядерных и хлоропластных SNP в 55 популяциях *P. abies* и *P. obovata* от Западной Европы до р. Енисей установлено, что гибридная зона простирается

от Карпат и Фенноскандии на западе до р. Оби на востоке [43]. Подтверждены полученные ранее другими исследователями данные об интрогрессии *P. obovata* в северные популяции *P. abies*, а *P. abies* в южные популяции *P. obovata*. Проведен совместный демографический анализ, подтверждающий множественные контакты видов в течение ледниковых циклов.

Недавние филогенетические исследования различных видов рода *Picea*, основанные на сравнительном транскриптомном анализе [58], также показали тесную связь между *P. abies* и *P. obovata*. Два этих вида входят в общую кладу с другими видами елей Северной Азии (*P. koraiensis*, *P. meyeri*, *P. asperata*, *P. crassifolia*, *P. retroflexa* Mast.) и Японского архипелага (*P. glehnii*, *P. koyamae* Shiras.), но дифференцируются от них с образованием отдельного кластера.

Следует однако отметить, что, несмотря на большое число работ, посвященных изучению *P. abies*, *P. obovata*, *P. koraiensis*, по морфологическим признакам и при использовании различных маркеров ядерного и цитоплазматических геномов, многие вопросы, касающиеся пространственного распределения генетической изменчивости на ареалах этих видов, структуры и дифференциации популяций в предполагаемых зонах интрогрессии видов, филогенетических взаимоотношений между видами, требуют дополнительных, более детальных исследований. Остается открытым вследствие слабой изученности и вопрос о видовом статусе ели корейской на российском Дальнем Востоке. Для определения структуры произрастающей в этом регионе ели и оценки степени ее генетического сходства со структурой популяций ели сибирской необходимо привлечь для исследования двух этих видов ДНК-маркеры, которые широко и успешно используются для изучения генетического разнообразия, структуры, дифференциации и филогении видов хвойных, в том числе видов рода *Picea*.

В задачи настоящей работы входило проведение сравнительного генетического исследования видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis* с помощью маркеров хпДНК. Передаваемая через пыльцу хпДНК имеет более высокие скорости генного потока, чем мтДНК, распространяемая семенами, и лучше всего подходит для выявления генетических различий между видами. В работе нами использованы универсальные для видов сем. *Pinaceae* хлоропластные микросателлитные локусы (cpSSR) [59], успешно применявшиеся ранее для исследования генетической структуры елей [29, 41, 49, 60] и других хвойных [61–63]. Сравнительно высокая изменчивость микросателлитов хпДНК, а также характерное для цитоплазматических геномов отсутствие рекомбинации и унипарентальное наследование, обуславливающее двукратное снижение эффективного размера популяции,

обеспечивают большую чувствительность *срSSR* в отношении сокращения численности популяций и изоляции [63]. В настоящее время хлоропластные микросателлиты являются одними из наиболее информативных маркеров для изучения популяционной и филогеографической структуры видов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены четыре группы популяций видового комплекса *P. abies*—*P. obovata*—*P. koraiensis*: популяции *P. abies* из Восточной Европы (Беларусь, Польша), популяции ели из европейской части России, Урала и Западно-Сибирской равнины, расположенные в зоне предполагаемой интрогрессивной гибридизации *P. abies* и *P. obovata*, популяции *P. obovata* из различных частей обширного ареала этого вида в Сибири и в Монголии, а также популяции *P. koraiensis*, естественно произрастающей в Приморском крае и Амурской области России, а также на северо-востоке Китая. Изучение генетической структуры, внутри- и межвидовой дифференциации популяций проводили на основе анализа изменчивости трех микросателлитных локусов хпДНК: Pt63718, Pt26081 и Pt71936, разработанных на основе хлоропластного генома *Pinus thunbergii* Parl. [59]. В качестве материала для исследований использовали образцы хвои и зародыши семян. Всего было проанализировано 35 популяций елей. Их местоположение, географические координаты и параметры изменчивости приведены на рис. 1 и в табл. 1.

Выделение геномной ДНК проводили методом СТАВ [66] из высушенной в силикагеле хвои и из зародышей семян. ДНК каждого фрагмента амплифицировали в 10 мкл смеси, содержащей 1 × ПЦР буфер (75 мМ Трис-НСl pH 8.8, 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Твин 20), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 200 мкМ каждого dNTP, по 0.2 мкМ прямого и обратного праймера, 0.5 ед. полимеразы Taq (производство MBI Fermentas или Сибэнзим) и 10 нг геномной ДНК. Температурный профиль соответствовал приведенному в работе [59]. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра. Вариант размера (число микросателлитных повторов) рассматривали как аллель данного локуса, а комбинацию аллелей трех *срSSR*-локусов у индивидуума — как гаплотип.

Популяционно-генетический анализ проводили на основании общепринятых в популяционной генетике статистических параметров, описывающих уровень изменчивости и дифференциации. В каждой популяции, используя GenAlEx 6.502 [67], были определены показатели генетической изменчивости: число выявленных гаплотипов ( $N_h$ ), гаплотипическое разнообразие ( $h$ ), несмещенное

гаплотипическое разнообразие ( $uh$ ), проведен анализ иерархической структуры изменчивости AMOVA (внутри популяций, между популяциями внутри видов, между видами) [68], вычислены индексы фиксации  $\Phi_{PT}$  между популяциями. Индекс фиксации  $\Phi_{PT}$ , так же как и наиболее часто используемый в популяционных исследованиях индекс фиксации  $F_{ST}$ , отражает степень генетической дифференциации между популяциями, однако в отличие от последнего не зависит от уровня внутривидовой изменчивости [69]. Статистическую значимость индексов фиксации оценивали с помощью 999 пермутаций. Для выявления пространственного распределения генетической изменчивости был проведен Principal Coordinates Analysis (PCoA) матрицы парных межпопуляционных значений  $\Phi_{PT}$ , рассчитанных по частотам аллелей *срSSR*-локусов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

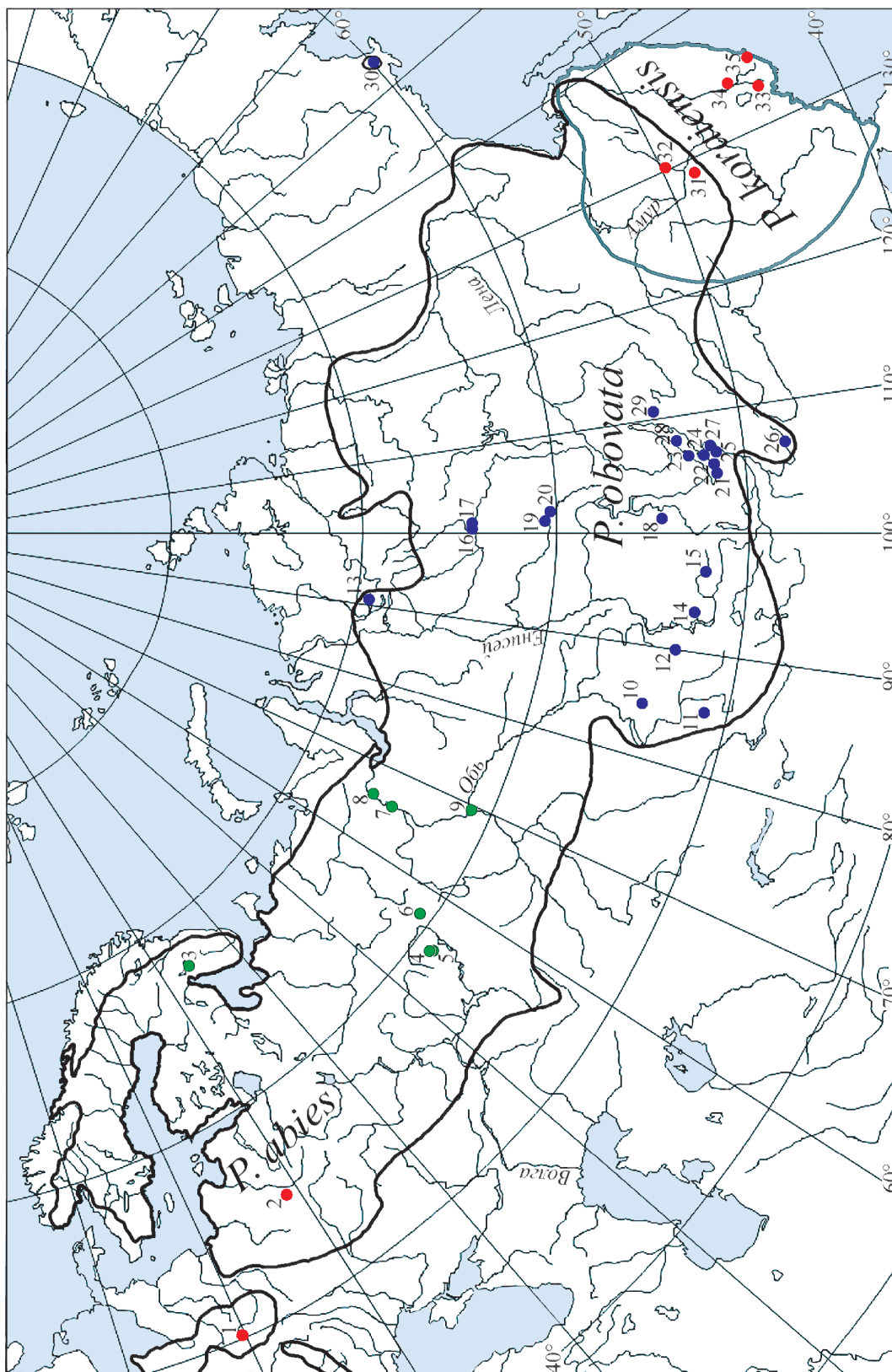
Всего при анализе 920 индивидуумов из 35 популяций елей в трех хлоропластных локусах идентифицировано 20 аллелей. На рис. 2 представлена диаграмма встречаемости аллелей каждого из изученных локусов в четырех группах популяций исследованного видового комплекса.

Из семи аллелей локуса Pt63718 лишь три (5, 6 и 7) являются общими. Наиболее высокую частоту встречаемости во всех изученных группах имеет аллель 6. Аллели 1, 3 и 4 относятся к категории редких. В локусе Pt26081 из восьми выявленных аллелей общим и наиболее распространенным является аллель 6. Аллели 1, 4 обнаружены только в популяциях *P. obovata*, а также в нескольких популяциях из зоны контакта ареалов этого вида с *P. abies*. Три редких аллеля (3, 8 и 9) встретились у отдельных индивидуумов в 1–2 популяциях *P. obovata* и *P. abies* × *P. obovata*. В локусе Pt71936 общим для трех исследованных видов елей является лишь аллель 2. Аллель 3 достаточно широко представлен в популяциях *P. obovata* и *P. abies*, но отсутствует у *P. koraiensis*. В изученных популяциях этого вида преобладает аллель 1, частота которого варьирует от 0.900 до 1. У *P. obovata* аллель 1 также выявляется в некоторых популяциях, но с очень низкой частотой (менее 10%).

Общее число аллелей, обнаруженных в трех *срSSR*-локусах, существенно варьирует в изученных популяциях ели. Самый низкий уровень аллельного разнообразия наблюдается в популяциях *P. koraiensis* (4–9 аллелей). В остальных проанализированных популяциях общее число выявленных аллелей колеблется в пределах от 8 до 15.

Комбинацию аллелей трех *срSSR*-локусов, проанализированных у индивидуума, рассматривали как гаплотип. Всего при генотипировании 920 экз. ели в 35 популяциях было идентифицировано





**Рис. 1.** Географическое расположение изученных популяций видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis*. Черной линией обозначен ареал ели европейской [9] и ели сибирской [6], серой – ареал ели корейской [64]. Цифрами обозначены номера популяционных выборок из табл. 1.



Таблица 1. Местоположение и параметры изменчивости включенных в исследование популяций ели

№	Популяции	Местоположение	Координаты с.ш. / в.д.	n	N <sub>h</sub>	h	uh
<i>Picea abies</i>							
Зона контакта ареалов <i>Picea abies</i> и <i>Picea obovata</i>							
1	Карпаты	Польща, Бабыя гора (1364 м)	49° 35' / 19° 33'	39	13	0.810	0.831
2	Домжерицы	Беларусь, Березинский з-к	54° 44' / 28° 19'	22	11	0.851	0.892
	Среднее			30.5	12	0.831	0.862
3	Хибины	Мурманская обл.	67° 39' / 33° 38'	21	8	0.844	0.886
4	Юрюзань	Челябинская обл., р. Юрюзань (487 м)	54° 41' / 58° 48'	23	12	0.881	0.921
5	Иремель	Башкортостан, г. Иремель (1340 м)	54° 33' / 58° 52'	25	10	0.662	0.690
6	Екатеринбург	Свердловская обл.	56° 47' / 60° 48'	22	10	0.855	0.896
7	Казым Мыс	Ханты-Мансийский АО, р. Обь	64° 40' / 65° 37'	19	11	0.859	0.906
8	Питляр	Ямало-Ненецкий АО, р. Обь	65° 50' / 65° 55'	24	10	0.823	0.859
9	Ханты-Мансийск	Ханты-Мансийский АО, р. Обь	61° 02' / 69° 20'	20	10	0.820	0.863
	Среднее			22	10.1	0.821	0.860
<i>Picea obovata</i>							
10	Елбань	Новосибирская обл., Маслянинский р-н	54° 18' / 84° 37'	29	10	0.842	0.872
11	Ильинка	Алтай, Шебалинский р-н	51° 22' / 85° 10'	30	7	0.758	0.784
12	Майский	Хакасия, Усть-Абаканский р-н	53° 36' / 90° 00'	19	10	0.881	0.930
13	Плаго Путорана	Красноярский край, Таймырский Долгано-Ненецкий р-н	69° 24' / 90° 42'	21	9	0.825	0.867
14	Ергаки	Красноярский край, Ермаковский р-н	52° 47' / 93° 23'	29	11	0.842	0.872
15	Азас	Тыва, Тоджинский р-н, з-к «Азас»	52° 15' / 96° 20'	29	11	0.790	0.818
16	Кочечум	Красноярский край, Эвенкийский р-н	64° 19' / 100° 14'	30	7	0.718	0.743
17	Тура	Красноярский край, Эвенкийский р-н	64° 18' / 100° 25'	29	10	0.809	0.837
18	Тулوشка	Иркутская обл., Куйтунский р-н	54° 27' / 101° 12'	29	16	0.892	0.924

Таблица 1. Окончание

№	Популяции	Местоположение	Координаты с.ш. / в.д.	<i>n</i>	<i>N<sub>h</sub></i>	<i>h</i>	<i>uh</i>
19	Тунгусский з-к	Красноярский край, Эвенкийский р-н	60°37' / 101°39'	29	10	0.759	0.786
20	Ванавара	Красноярский край, Эвенкийский р-н	60°21' / 102°16'	30	14	0.904	0.936
21	Выдрино	Бурятия, Кабанский р-н	51°26' / 104°43'	58	17	0.856	0.871
22	Хамар-Дабан	Бурятия, уроч. Бушелай	51°32' / 105°52'	30	8	0.724	0.749
23	Косая Степь	Иркутская обл., Ольхонский р-н	52°51' / 106°04'	29	10	0.835	0.865
24	Кабанск	Бурятия, Кабанский р-н	51°59' / 106°32'	25	11	0.851	0.887
25	Убукун	Бурятия, Селенгинский р-н	51°28' / 106°43'	30	12	0.784	0.811
26	Богд-Уул	Монголия, з-к «Богд-Уул»	47°48' / 106°51'	30	9	0.760	0.786
27	Красноярово	Бурятия, Иволгинский р-н	51°51' / 107°16'	29	12	0.837	0.867
28	Ольхон	Иркутская обл., о. Ольхон	53°15' / 107°43'	27	9	0.842	0.875
29	Баргузинский з-к	Бурятия, р. Баргузин	54°35' / 110°47'	29	9	0.787	0.815
30	Магадан	Магаданская обл., Магаданский з-к	59°39' / 153°04'	27	6	0.529	0.550
	Среднее			29.4	10.4	0.801	0.831
<i>Picea koraiensis</i>							
31	Малый Хинган	Китай, Провинция Хэйлунцзян	48° / 129°	16	2	0.117	0.125
32	Бурейская	Амурская обл., Бурейский р-н, р. Талая	49°47' / 130°14'	30	7	0.491	0.508
33	Анучино	Приморский край, Анучинский р-н	43°59' / 133°07'	13	3	0.272	0.295
34	Малиново	Приморский край, Дальнереченский р-н	45°29' / 134°18'	14	2	0.133	0.143
35	Ольга	Приморский край, Ольгинский р-н	43°44' / 135°17'	14	4	0.367	0.396
	Среднее			17.4	3.6	0.276	0.293
	Среднее для 35 популяций (SE)			26.3 (1.4)	9.5 (0.6)	0.732 (0.035)	0.762 (0.036)

Примечание. *n* – размер выборки; *N<sub>h</sub>* – число гаплотипов; *h* – гаплотипическое разнообразие; *uh* – несмещенное гаплотипическое разнообразие [65]; з-к – заповедник.

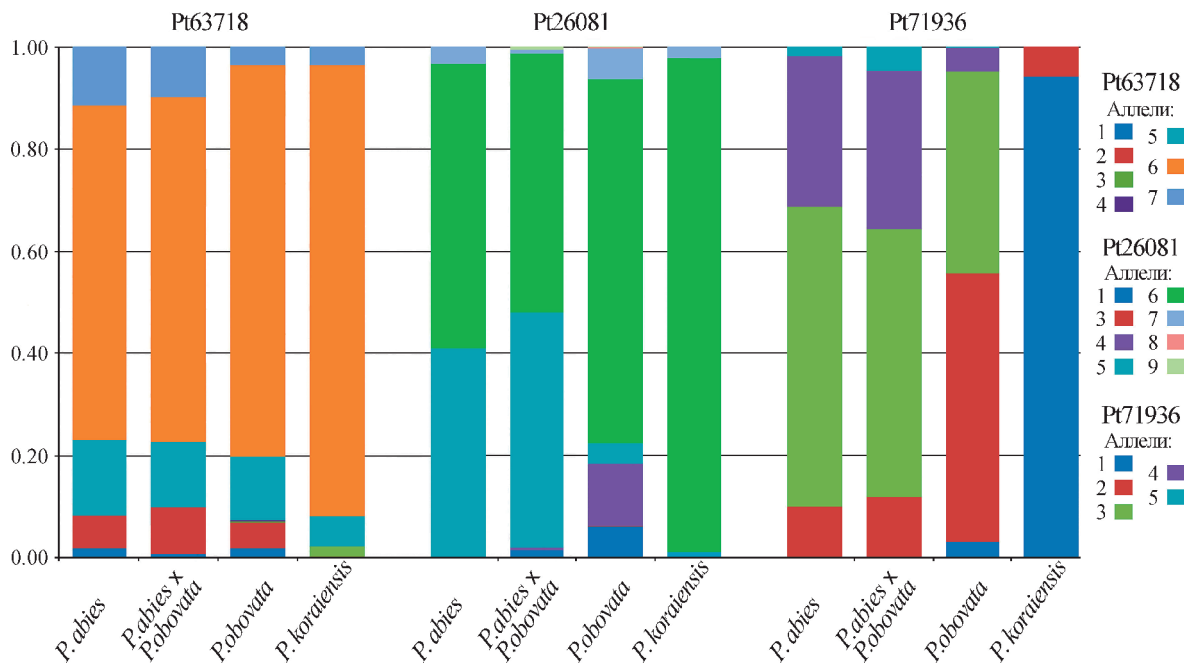


Рис. 2. Частоты аллелей трех cpSSR-локусов в четырех группах популяций видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis*.

57 гаплотипов. В отдельных популяциях число выявленных гаплотипов варьировало от 2 до 17 (см. табл. 1). Распределение гаплотипов неравномерное: два гаплотипа 6/6/3 (номера аллелей в локусах Pt63718/Pt26081/Pt71936) и 6/6/2 встречались в изученных популяциях ели чаще других. Гаплотип 6/6/3 отсутствовал лишь в популяциях *P. koraiensis*, а гаплотип 6/6/2 – в популяции *P. abies* (Домжерицы) и в популяциях Хибины, Екатеринбург, Юрюзань, Иремель, Ханты-Мансийск из зоны контакта *P. abies* и *P. obovata*. Самая высокая частота встречаемости гаплотипа 6/6/3 наблюдалась в популяции *P. obovata* из Магаданского заповедника (66.7%), в остальных изученных популяциях *P. abies* и *P. obovata* его частота варьировала от 4.5% до 56%, составляя в среднем 24.7%. Гаплотип 6/6/2, максимально представленный в популяции ели сибирской Хамар-Дабан (43.3%), обнаруживается в других изученных популяциях ели этого вида с более низкой частотой, составляющей в среднем 26.4%. У *P. abies*, *P. koraiensis* и в зоне контакта ареалов *P. abies* и *P. obovata* гаплотип 6/6/2 также выявляется в ряде популяций, но его частота в этих популяциях не превышает 10%. Остальные гаплотипы, из обнаруженных у *P. obovata*, встречаются в популяциях значительно реже (2/6/2, 5/1/3, 5/6/2, 6/4/2, 6/7/2) или относятся к категориям редких и уникальных. В популяциях *P. abies*, кроме гаплотипа 6/6/3, выявляются и другие гаплотипы, частоты встречаемости которых варьируют в пределах от 2.6 до 27%. В зоне контакта ареалов видов обнаружены

как редкие, так и наиболее распространенные (5/5/2, 6/5/3, 6/5/4, 6/6/2, 6/6/3, 6/6/4) у *P. obovata* и *P. abies* гаплотипы.

Популяции *P. koraiensis* существенно отличаются по составу гаплотипов от популяций двух других видов ели. В популяциях этого вида с достаточно высокой частотой (0.700–0.938) преобладает гаплотип 6/6/1. Кроме того, в некоторых популяциях обнаружены редкие гаплотипы 3/6/2, 5/6/1, 6/5/1, 6/6/2, 6/7/1, 7/6/1. Следует отметить, что бурейскую популяцию ели, включенную нами в группу *P. koraiensis*, ранее мы рассматривали как популяцию *P. obovata* [52]. Однако в результате предварительного анализа изменчивости cpSSR-локусов было установлено, что она значительно отличается по набору гаплотипов от популяций этого вида. Поэтому сочли целесообразным включить ее в группу популяций *P. koraiensis*, с которыми она имеет большее сходство по генетической структуре. Еще А.Я. Орлов [70] отмечал, что ель сибирская, произрастающая в бассейне Буреи, по своим морфологическим и экологическим признакам отличается от типичной ели сибирской и по ряду параметров сходна с елью корейской.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что число ( $N_h$ ) и несмещенное разнообразие ( $uh$ ) гаплотипов, обнаруженных в исследованных популяциях трех видов елей, варьируют в достаточно широких пределах: от 2 до 17 и от 0.125 до 0.936, соответственно. Самые низкие параметры изменчивости наблюдаются в популяциях *P. koraiensis*.

Среднее значение  $uh$  составило всего 0.293. У *P. abies* и *P. obovate*, и в зоне контакта их ареалов средний уровень гаплотипического разнообразия почти в 3 раза выше, чем у *P. koraiensis*: 0.862, 0.831 и 0.860 соответственно. Среди изученных популяций из зоны контакта ареалов *P. abies* и *P. obovata* самое низкое несмещенное гаплотипическое разнообразие наблюдалось в высокогорной популяции Ирмель (0.690), самое высокое – в популяции Юрюзань (0.921). У *P. obovata* минимальное значение показателя  $uh$  установлено в популяции Магадан (0.550), которая представляет собой крайнее северо-восточное небольшое по площади изолированное местонахождение ели сибирской, оторванное на значительное расстояние от основного ареала вида [71]. Низкие параметры  $srSSR$ -изменчивости в этой популяции, вероятнее всего, являются результатом сокращения численности и длительной изоляции популяции в прошлом («bottleneck»), что подтверждает высокая частота (66.7%) одного из шести обнаруженных в популяции гаплотипов. Максимальное значение показателя  $uh$  отмечено в северной популяции Ванавара из Эвенкии (0.936). В среднем для 35 изученных популяций елей значения показателей  $N_h$  и  $uh$  равны соответственно 9.5 и 0.762.

AMOVA показал, что 17.1% общего генетического разнообразия ( $\Phi_{RT} = 0.171$ ,  $p = 0.001$ ), выявленного при исследовании четырех групп популяций видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis*, распределяются между группами популяций, 1.5% ( $\Phi_{PR} = 0.017$ ,  $p = 0.001$ ) – между популяциями внутри групп, а остальные 81.5% изменчивости реализуются внутри популяций ( $\Phi_{PT} = 0.185$ ,  $p = 0.001$ ) (табл. 2).

Достаточно высокая доля межгрупповой изменчивости, во много раз превышающая долю изменчивости среди популяций внутри групп, свидетельствует о значительной генетической дифференциации елей, входящих в исследуемый видовой комплекс. Для визуализации генетических различий между изученными видами на основе матрицы

парных значений индексов  $\Phi_{RT}$ , вычисленных по частотам аллелей трех проанализированных локусов, был выполнен PCoA (рис. 3).

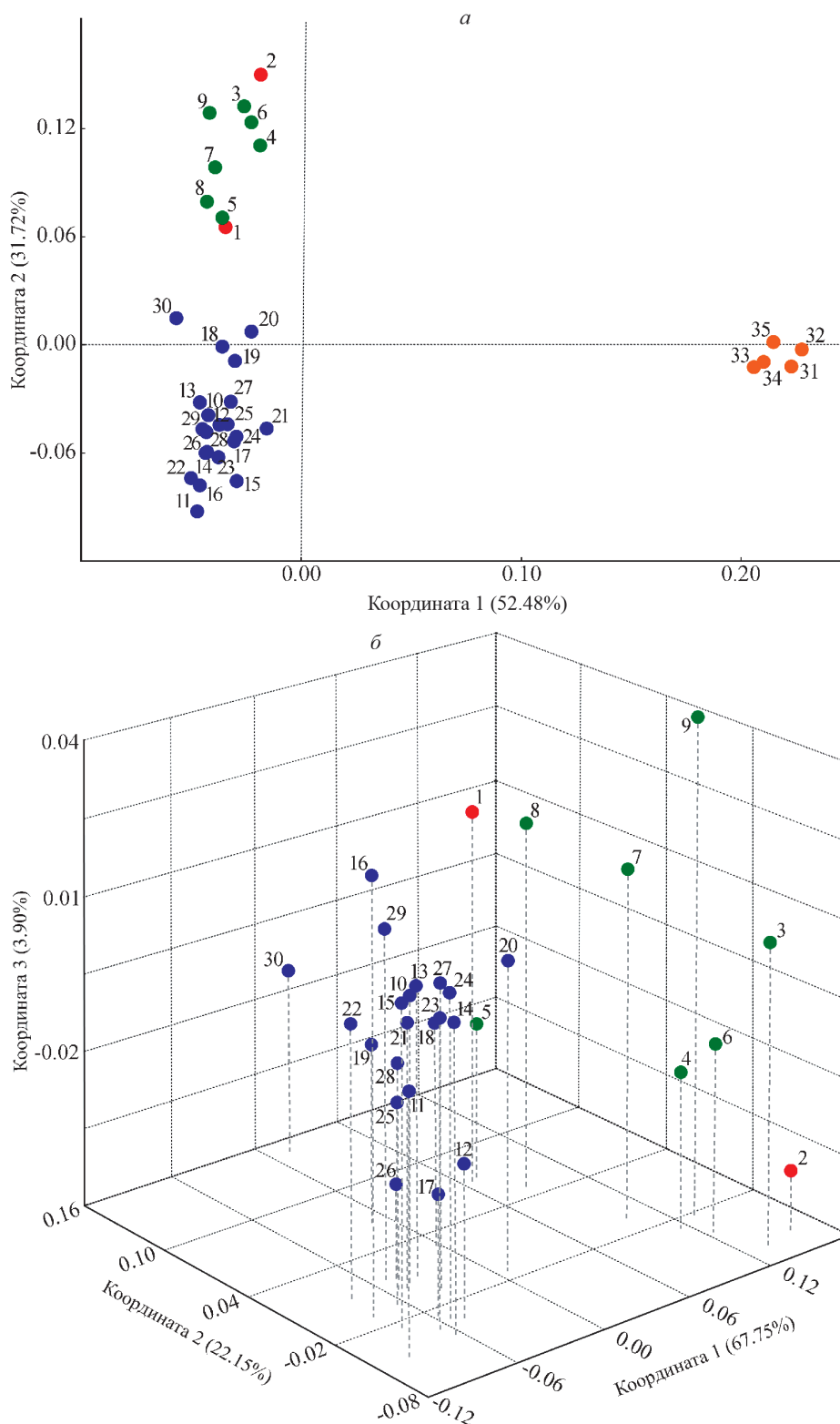
На рис. 3, а представлены результаты ординации 35 популяций елей на плоскости двух главных координат. Исследованные популяции образуют несколько пространственно разобщенных групп. Одна из групп, самая многочисленная, представлена популяциями *P. obovata*. Лишь популяция *P. obovata* из Магаданской области располагается на некотором удалении от группы популяций этого вида, что свидетельствует о существенном отличии гаплотипического состава магаданской популяции от остальных включенных в анализ популяций ели сибирской. Особенность данной популяции заключается в том, что в ней преобладает с достаточно высокой частотой встречаемости (66.7%) гаплотип 6/6/3, который в других популяциях этого вида обнаруживается с более низкой частотой, составляющей в среднем 21.7%. Ранее при исследовании генетического разнообразия и дифференциации популяций ели сибирской по ядерным микросателлитным локусам также было показано, что магаданская популяция максимально дифференцируется от остальных изученных популяций ели сибирской и характеризуется самым низким уровнем генетического разнообразия [48].

Вторая группа, находящаяся на некотором удалении от группы популяций *P. obovata*, включает в себя популяции *P. abies* и популяции ели из зоны контакта ареалов *P. abies* и *P. obovata* (см. рис. 3, а). Эта группа разделена на две слабо дифференцированные друг от друга подгруппы (см. рис. 3, б), одна из которых представлена нижеобскими популяциями ели (Казым Мыс, Питляр, Ханты-Мансийск) и высокогорной популяцией *P. abies* из Карпат, а другая объединяет две уральские популяции (Юрюзань, Екатеринбург), популяцию Хибинь из Мурманской области и популяцию *P. abies* Домжерицы. Популяция Ирмель из высокогорных мест обитания на Урале отделена пространственно от остальных изученных популяций ели из зоны

**Таблица 2.** Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) по гаплотипам хпДНК в 35 популяциях видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis*

Уровень изменчивости	<i>d. f.</i>	Сумма квадратов отклонений	Компоненты изменчивости	Доля изменчивости, %	<i>p</i>
Между группами	3	40.414	0.083	17.1	0.001
Между популяциями внутри групп	31	17.984	0.007	1.5	0.001
Внутри популяций	885	349.551	0.395	81.5	0.001
Всего	919	407.945	0.485	100	





**Рис. 3.** Ординация изученных популяций елей на плоскости главных координат по данным матрицы парных значений  $\Phi_{PT}$ , вычисленных по частотам аллелей трех *sr*SSR-локусов: *а* – ординация 35 популяций видового комплекса *P. abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis*; *б* – ординация популяций *P. obovata*, *P. abies* и популяций из зоны контакта ареалов этих видов. Нумерация популяций соответствует табл. 1. Синим обозначены популяции *P. obovata*, красным – *P. abies*, зеленым – популяции из зоны контакта ареалов *P. obovata* и *P. abies*, оранжевым – *P. koraiensis*.

контакта ареалов видов и имеет более низкий по сравнению с ними уровень гаплотипического разнообразия. В недавней работе, посвященной изучению популяционной структуры и совместной демографической истории *P. abies* и *P. obovata* на основе анализа изменчивости ядерных и хлоропластных SNP [43], также были включены особи ели с горы Ирмель. Показано, что эта высокогорная популяция характеризуется низким нуклеотидным разнообразием, а ее особи группируются отдельно от близлежащих низкогорных популяций, образуя отдельный кластер.

Отдельную группу на плоскости двух главных координат образуют популяции *P. koraiensis*, пространственное расположение которых указывает на достаточно высокую степень их дивергенции от групп популяций европейской и сибирской елей (см. рис. 3, а).

Полученные на основании анализа изменчивости трех микросателлитных локусов хпДНК результаты свидетельствуют о существенных различиях между исследованными группами популяций видового комплекса *P. abies*—*P. obovata*—*P. koraiensis* по составу и числу выявленных гаплотипов, уровню генетического разнообразия и структуре популяций. Наиболее значительная дифференциация по этим показателям наблюдается между популяциями из зоны контакта ареалов *P. abies* и *P. obovata*, популяциями *P. abies* и *P. obovata* с одной стороны и популяциями *P. koraiensis* с другой стороны ( $\Phi_{RT} = 0.369$ ,  $\Phi_{RT} = 0.403$  и  $\Phi_{RT} = 0.336$  соответственно). Степень дифференциации между популяциями двух близких видов *P. abies* и *P. obovata* оказалась на порядок ниже ( $\Phi_{RT} = 0.043$ ). Недавние филогенетические исследования различных видов рода *Picea*, основанные на сравнительном транскриптомном анализе [58], также показали, что *P. abies* и *P. obovata* генетически гораздо ближе друг к другу, чем к *P. koraiensis*.

В ходе проведенного нами исследования установлено, что самый высокий уровень генетического разнообразия среди четырех включенных в анализ групп популяций наблюдается в популяциях ели европейской и популяциях, расположенных в зоне контакта ареалов *P. abies* и *P. obovata* (см. табл. 1). Выявление в этой зоне гаплотипов, характерных для ели сибирской, и гаплотипов, встречающихся только у ели европейской, в очередной раз подтверждает существование широкой зоны интрогрессивной гибридизации между этими видами. При сравнении входящих в комплекс видов обнаружено также заметное снижение уровня генетического разнообразия в восточном направлении. У *P. abies* среднепопуляционное значение показателя  $uh$  равняется 0.862, у *P. obovata* — 0.831, а у *P. koraiensis* — 0.293. Более низкий уровень генетического разнообразия у ели сибирской по сравнению с елью европейской обнаружен также

при сравнительном анализе популяций *P. abies* и *P. obovata* с помощью матерински наследуемого митохондриального фрагмента *nad1* (интрон 2) и наследуемого по отцовской линии хлоропластного региона *trnT*—*trnL* [35–37, 39].

Полученные в ходе исследования данные о значительной генетической дивергенции ели, произрастающей на российском Дальнем Востоке, от двух других видов комплекса *P. abies*—*P. obovata*—*P. koraiensis*, в том числе от ели сибирской, подтверждают ее статус в качестве отдельного вида *P. koraiensis*. Следует, однако, отметить, что ель из Амурской области, изученная нами ранее по митохондриальному локусу *mh44* [52], обнаруживает сходство с другими популяциями ели сибирской, тогда как по гаплотипическому составу исследованных нами хлоропластных микросателлитов эта популяция более близка к изученным популяциям ели корейской. В ней преобладает тот же гаплотип, что и в остальных популяциях этого вида. Расхождение между данными, полученными на основе анализа маркеров цитоплазматического генома, различающихся типом наследования, подтверждает наличие зоны интрогрессивной гибридизации между елью сибирской и елью корейской, существование которой впервые предположил Е.Г. Бобров [2]. В связи с этим необходимы дополнительные исследования с привлечением большего числа популяционных выборок как ели корейской, так и ели сибирской, особенно с малоизученного ранее обширного региона к востоку от оз. Байкал. Более детальные исследования популяций этих видов на Дальнем Востоке России позволят получить данные о границах ареалов «чистых» видов *P. obovata* и *P. koraiensis*, а также зоны их межвидовой гибридизации.

Таким образом, полученные при сравнительном исследовании видового комплекса *P. abies*—*P. obovata*—*P. koraiensis* результаты свидетельствуют об эффективности использования микросателлитных локусов хпДНК с высокой скоростью потока генов не только для определения уровня генетического разнообразия видов, выявления степени их дифференциации, но и для установления видового статуса спорных таксонов.

Авторы выражают благодарность Л.В. Кривобокву, И.В. Тихоновой, К.Г. Хомутовой, С. Жамьянсурену, В.Н. Усову, С.Н. Горошкевичу, О.А. Мочаловой, Е.А. Андриановой, Е.В. Волкову и Е.Г. Филлипову за предоставленные образцы ели.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИЛ СО РАН, проект № FWES-2024-0028 и Государственного задания ИЭРиЖ УрО РАН, № 122021000090-5.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Правдин Л. Ф. Ель европейская и ель сибирская в СССР. М.: Наука, 1975. 176 с.
2. Бобров Е. Г. Лесообразующие хвойные СССР. Л.: Наука, 1978. 188 с.
3. Крюсман Г. Хвойные породы. М.: Лесн. пром-сть, 1986. 256 с.
4. Коропачинский И. Ю., Встовская Т. Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002. 707 с.
5. Попов П. П. Ель европейская и сибирская: структура, интерградация и дифференциация популяционных систем. Новосибирск: Наука, 2005. 233 с.
6. Ареалы деревьев и кустарников СССР: в 3-х т. / сост. С. Я. Соколов, О. А. Связева, В. А. Кубли и др. Л.: Наука, 1977. Т. 1. 164 с.
7. Недолужко В. А. Конспект дендрофлоры российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 1995. 208 с.
8. Воробьев Д. П. Дикорастущие деревья и кустарники Дальнего Востока. Л., 1968. 278 с.
9. Schmidt-Vogt H. Die Fichte. Hamburg; Berlin: Paul Parey, 1977. Bd. 1. 647 s.
10. Ворошилов В. Н. Определитель растений советского Дальнего Востока. М.: Наука, 1982. 612 с.
11. Коропачинский И. Ю. Сосновые – Pinaceae Lindl. // Сосудистые растения Дальнего Востока. Л.: Наука, 1989. С. 9–20.
12. Liu Tang-shui. A new proposal for the classification of the genus *Picea* // Acta Phytotax. Geobot. 1982. V. 33. № 4. P. 227–245.
13. Усенко Н. В. Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока. Хабаровск, 1984. 272 с.
14. Ворошилов В. Н. Критический пересмотр некоторых видов флоры Дальнего Востока // Бюл. ГБС. 1984. Вып. 134. С. 33–39.
15. Farjon A. World Checklist and Bibliography of Conifers. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001. 309 p.
16. Потемкин О. Н. Ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.) в Сибири и на Дальнем Востоке (изменчивость, гибридизация, таксономия): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1994. 17 с.
17. Усов В. Н. Ель корейская и леса из ели корейской в Приморском крае: Автореф. дис. .... д-ра с.-х. наук. Уссурийск, 2006. 32 с.
18. Потемкин О. Н., Рудиковский А. В., Потемкина О. В. Полиморфизм морфологических характеристик елей подрода *Picea* (Pinaceae) в восточных районах обитания // Растительный мир Азиатской России. 2012. № 2(10). С. 19–26.
19. Карпюк Т. В., Владимирова О. С., Муратова Е. Н. Кариологический анализ ели корейской (*Picea koraiensis* Nakai) // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2005. № 4. С. 67–77.
20. Potenko V. V. Relationships among spruces (*Picea* A. Dietr., Pinaceae) of the Russian Far East // Plant Syst. Evol. 2007. V. 268. № 1–4. P. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0551-0>
21. Plants of the World Online, 2024. <https://powo.science.kew.org> (дата обращения: 24.05.2024).
22. World Flora Online, 2024. <http://www.worldfloraonline.org> (дата обращения: 24.05.2024).
23. Du F. K., Petit R. J., Liu J. Q. More introgression with less gene flow: Chloroplast vs. mitochondrial DNA in the *Picea asperata* complex in China, and comparison with other Conifers // Mol. Ecol. 2009. V. 18. P. 1396–1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04107.x>
24. Wang Y, Jiang Z, Qin A. et al. Population structure, genetic diversity and candidate genes for the adaptation to environmental stress in *Picea koraiensis* // Plants. 2023. V. 12(6). P. 1266. <https://doi.org/10.3390/plants12061266>
25. Голубец М. А. Современная трактовка объема вида *Picea abies* (L.) Karst. и его внутривидовых таксонов // Ботан. журн. 1968. Т. 53. № 8. С. 1048–1062.
26. Orlova L., Gussarova G., Glazkova E. et al. Systematics and distribution of spruce species in the North-West of Russia // Dendrobiology. 2020. V. 84. P. 12–29. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.084.002>
27. Giannini R., Morgante M., Vendramin G.G. Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. // Silvae Genetica. 1991. V. 40. № 3–4. P. 160–166.
28. Krutovskii K. V., Bergmann F. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci // Heredity. 1995. V. 74. P. 464–480.
29. Vendramin G. G., Anzidei M., Madaghiale A. et al. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.) // Genome. 2000. V. 43. № 1. P. 68–78. <https://doi.org/10.1139/g99-093>
30. Meloni M., Perini D., Binelli G. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations in the western Alps // J. Biogeography. 2007. V. 34. № 6. P. 929–938. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01668.x>
31. Scotti I., Gugerli F., Pastorelli R. et al. Maternally and paternally inherited molecular markers elucidate population patterns and inferred dispersal processes on a small scale within a subalpine stand of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) // Forest Ecology



- and Management. 2008. V. 255. № 11. P. 3806–3812. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.03.023>
32. *Tollefsrud M.M., Kissling R., Gugerli F. et al.* Genetic consequences of glacial survival and post-glacial colonization in Norway spruce: Combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. № 18. P. 4134–4150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03893.x>
  33. *Tollefsrud M. M., Sonstebo J. H., Brochmann C. et al.* Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies* // *Heredity.* 2009. V. 102. № 6. P. 549–562. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.16>
  34. *Мудрик Е. А., Политов Д. В., Белоконь М. М., Привалихин С. Н.* Генетическая изменчивость ели европейской по данным микросателлитных локусов // Биосфера Земли: прошлое, настоящее и будущее: Материалы конф. молодых ученых (21–25 апреля 2008), ИЭРиЖ УрО РАН. Екатеринбург: Голицкий, 2008. С. 154–157.
  35. *Tollefsrud M. M., Sperisen Ch.* Paternal introgression from Siberian spruce (*Picea obovata*) to Norway spruce (*P. abies*): Tracing pollen and seed flow with chloroplast and mitochondrial DNA // Conservation of Forest Genetic Resources in Siberia: Proc. 3-rd Intern. conf. (August 23–29, 2011). Krasnoyarsk, Russia, 2011. P. 162.
  36. *Tollefsrud M. M., Latałowa M., van der Knaap W. O. et al.* Late Quaternary history of North Eurasian Norway spruce (*Picea abies*) and Siberian spruce (*Picea obovata*) inferred from macrofossils, pollen and cytoplasmic DNA variation // *J. Biogeography.* 2015. V. 42. № 8. P. 1431–1442. <https://doi.org/10.1111/jbi.12484>
  37. *Мудрик Е. А., Полякова Т. А., Шатохина А. В. и др.* Пространственное распределение гаплотипов второго интрона гена *nad1* в популяциях комплекса европейской и сибирской елей (*Picea abies*–*P. obovata*) // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 10. С. 1117–1125. <https://doi.org/10.7868/S0016675815100124>
  38. *Tsuda Y., Chen J., Stocks M. et al.* The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): Cryptic refugia as stepping stones to the west? // *Mol. Ecol.* 2016. V. 25. № 12. P. 2773–2789. <https://doi.org/10.1111/mec.13654>
  39. *Мудрик Е. А., Полякова Т. А., Белоконь М. М. и др.* Генетическая дифференциация комплекса *Picea abies*–*P. obovata* по данным локуса *nad1* мтДНК // Сохранение лесных генетических ресурсов: Материалы 5-й Межд. конф.-совещ. (02–07 октября 2017). Гомель: ООО «Колордрук», 2017. С. 143–144.
  40. *Chen J., Li L., Milesi P. et al.* Genomic data provide new insights on the demographic history and the extent of recent material transfers in Norway spruce // *Evolutionary Applications.* 2019. V. 12. № 8. P. 1539–1551. <https://doi.org/10.1111/eva.12801>
  41. *Падутов В. Е., Каган Д. И., Ивановская С. И. и др.* Геноеография ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) по данным анализа цитоплазматической ДНК // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2021. Т. 65. № 4. С. 439–447. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-439-447>
  42. *Li L., Milesi P., Turet M. et al.* Teasing apart the joint effect of demography and natural selection in the birth of a contact zone // *New Phytologist.* 2022. V. 236. P. 1976–1987. <https://doi.org/10.1111/nph.18480>
  43. *Zhou O., Karunarathne P., Andersson-Li L. et al.* Recurrent hybridization and gene flow shaped Norway and Siberian spruce evolutionary history over multiple glacial cycles // *Mol. Ecol.* 2024. V. 33. № 17. P. 1–14 <https://doi.org/10.1111/mec.17495>
  44. *Янбаев Ю. А., Шигапов З. Х., Путенихин В. П., Бахтиярова Р. М.* Дифференциация популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) на Южном Урале // *Генетика.* 1997. Т. 33. № 9. С. 1244–1249.
  45. *Путенихин В. П., Шигапов З. Х., Фарукишина Г. Г.* Ель сибирская на Южном Урале и в Башкирском Предуралье (популяционно-генетическая структура). М.: Наука, 2005. 180 с.
  46. *Кравченко А. Н., Ларионова А. Я., Милютин Л. И.* Генетический полиморфизм ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в Средней Сибири // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 1. С. 45–53.
  47. *Кравченко А. Н., Ларионова А. Я., Экарт А. К.* Генетический полиморфизм популяций ели сибирской *Picea obovata* (Pinasea) в Азиатской части ареала // *Вестник СВНЦ ДВО РАН.* 2013. № 2. С. 74–85.
  48. *Кравченко А. Н., Экарт А. К., Ларионова А. Я.* Генетическое разнообразие и дифференциация популяций ели сибирской по ядерным микросателлитным локусам // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 11. С. 1262–1269. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090083>
  49. *Экарт А. К., Семерикова С. А., Семериков В. Л. и др.* Изменчивость аллозимных и сpSSR-маркеров в популяциях ели сибирской // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 3. С. 311–319. <https://doi.org/10.7868/S001667581603005X>
  50. *Шилкина Е. А., Ибе А. А., Шеллер М. А., Сухих Т. В.* Генетическая дифференциация популяций *Picea obovata* L. в регионах Сибири // *Хвойные бореальной зоны.* 2019. Т. 37. № 1. С. 68–73.
  51. *Ларионова А. Я., Семерикова С. А., Семериков В. Л. и др.* Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК ели сибирской // *Экология и эволюция: Материалы межд. симп., посвященного 100-летию академика С.С. Шварца* (1–5 апреля



- 2019). Екатеринбург: Гуманитарный ун-т, 2019. С. 318–320.
52. Экарт А. К., Семериков В. Л., Ларионова А. Я., Кравченко А. Н. Изменчивость локуса *th44* митохондриальной ДНК в популяциях ели сибирской // Генетика. 2020. Т. 56. № 7. С. 842–847. <https://doi.org/10.31857/S0016675820070036>
  53. Ильинов А. А., Топчиева Л. В., Раевский Б. В. Использование микросателлитных маркеров в изучении генофонда ели финской *Picea × fennica* (Regel) Ком. // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: Материалы 3-го Межд. совещания (23–29 августа 2011). Красноярск, Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 2011. С. 57–58.
  54. Потоккина Е. К., Орлова Л. В., Вишневецкая М. С. и др. Генетическая дифференциация популяций ели на северо-западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов // Экол. генетика. 2012. Т. 10. № 2. С. 40–49.
  55. Потоккина Е. К., Киселева А. А., Николаева М. А. и др. Использование маркеров оргanelльной ДНК для анализа филогеографии восточно-европейской популяции ели европейской *Picea abies* (L.) Н. Karst. // Вавил. журн. генетики и селекции. 2014. Т. 18. №4/1. С. 818–830.
  56. Volkova P., Shipunov A., Borisova P. et al. In search of hybridity: the case of Karelian spruces // Silva Fennica. 2014. V. 48. №.2 P. 1–14. <https://doi.org/10.14214/sf.1072>
  57. Попов П. П. Распространение особей промежуточной формы в популяциях елей европейской и сибирской // Сиб. лесной журн. 2018. № 4. С. 13–19.
  58. Shao C.-C., Shen T.-T., Jin W.-T. et al. Phylotranscriptomics resolves interspecific relationships and indicates multiple historical out-of-North America dispersals through the Bering Land Bridge for the genus *Picea* (Pinaceae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2019. V. 141. P. 106610. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106610>
  59. Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae // Mol. Ecol. 1996. V. 5. P. 595–598.
  60. Nasri N., Bojovic S., Vendramin G. G., Fady B. Population genetic structure of the relict Serbian spruce, *Picea omorika*, inferred from plastid DNA // Plant Syst. Evol. 2008. V. 271. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0594-2>
  61. Семерикова С.А., Семериков В.Л. Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихт *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt // Генетика. 2007. Т. 43. № 12. С. 1637–1646.
  62. Semerikova S. A., Semerikov V. L., Lascoux M. Post-glacial history and introgression in *Abies* (Pinaceae) species of the Russian Far East inferred from both nuclear and cytoplasmic markers // J. Biogeography. 2011. V. 38. № 2. P. 326–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02394.x>
  63. Семериков В. Л., Семерикова С. А., Дымышкова О. С. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Азии и Восточной Европе // Генетика. 2014. Т. 50. № 6. С. 660–669. <https://doi.org/10.7868/S0016675814040122>
  64. Урусов В. М., Лобанова И. Н., Варченко Л. И. Хвойные российского Дальнего Востока – ценные объекты изучения, охраны, разведения и использования. Владивосток: Дальнаука, 2007. 440 с.
  65. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
  66. Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theoret. Appl. Genetics. 1996. № 92. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
  67. Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
  68. Weir B. S., Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. № 6. P. 1358–1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
  69. Meirmans P. G. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure // Evolution. 2006. V. 60. № 11. P. 2399–2402. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01874.x>
  70. Орлов А. Я. Хвойные леса Амгунь-Буреинского междуречья. М., 1955. 208 с.
  71. Мочалова О. А., Андрианова Е. А. Об изолированных местонахождениях *Picea obovata* (Pinaceae) на северо-востоке России // Ботан. журнал. 2004. Т. 89. № 12. С. 1823–1839.

## Genetic Diversity, Structure and Differentiation of *Picea abies*–*Picea obovata*–*Picea koraiensis* Species Complex According to Data of Chloroplast DNA Microsatellite Analysis

A. Ya. Larionova<sup>1, \*</sup>, S. A. Semerikova<sup>2</sup>, A. K. Ekart<sup>1</sup>,  
A. N. Kravchenko<sup>1, \*\*</sup>, V. L. Semerikov<sup>2</sup>, M. A. Polezhaeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center Siberian Branch, Russian Academy of Sciences», Krasnoyarsk, 660036, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144, Russia*

\**e-mail: alya-larion@yandex.ru*

\*\**e-mail: kravchenko-anna.n@yandex.ru*

The results of a comparative study of the genetic structure, parameters of intraspecific genetic diversity and spatial differentiation of 35 populations of *Picea abies*–*P. obovata*–*P. koraiensis* species complex, located within the areas of distribution «pure» species and in the contact zones of their ranges were presented. *P. abies* populations from Eastern Europe (Belarus, Poland), spruce populations from the European part of Russia, the Urals and the West Siberian Plain, located in the zone of *P. abies* and *P. obovata* introgressive hybridization, *P. obovata* populations from various parts extensive range of this species in Siberia and Mongolia, as well as *P. koraiensis* populations from the Russian Far East and Northeast China were analysed. The study of genetic variability and differentiation of populations was carried out on the basis of an analysis of the variability of three microsatellite loci: Pt63718, Pt71936 and Pt26081, developed on the basis of *Pinus thunbergii* Parl chloroplast genome. The use of these DNA markers made it possible to obtain data indicating a fairly high degree of *P. koraiensis* genetic divergence from two other spruce species included in the complex, *P. abies* and *P. obovata*. Korean spruce growing in the Far East differs significantly from the populations of these species in the number and composition of haplotypes, the level of genetic diversity and population structure, which gives us reason to consider it as a separate species.

**Keywords:** *Picea abies*, *P. obovata*, *P. koraiensis*, cpSSR, haplotype variability, population structure, genetic differentiation.

УДК636.271; 57.072

## ИЗУЧЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ИЗ АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ НАХОДОК НА ТЕРРИТОРИИ ЯРОСЛАВЛЯ (XIII–XIV вв.)

© 2024 г. А. С. Абдельманова<sup>1, \*</sup>, М. С. Форнара<sup>1</sup>, Н. Ф. Бакоев<sup>1</sup>, Е. Е. Антипина<sup>1, 2</sup>,  
Л. В. Яворская<sup>1, 2</sup>, А. В. Доцев<sup>1</sup>, Н. А. Зиновьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,  
Московская область, пос. Дубровицы, 142132 Россия

<sup>2</sup>Институт археологии Российской академии наук, Москва, 117292 Россия

\*e-mail: [abdelmanova@vij.ru](mailto:abdelmanova@vij.ru)

Поступила в редакцию 04.04.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 27.06.2024 г.

В ходе эволюционных процессов и селекционной работы сформировались разнообразные массивы местных популяций скота, приспособленных к конкретным природно-климатическим условиям. Повышение селекционного давления и концентрация на нескольких высокопродуктивных породах привели к эрозии генетических ресурсов по всему миру. Одним из эффективных подходов к оценке генетического разнообразия является исследование полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК), которая демонстрирует высокий уровень изменчивости и характеризуется отсутствием рекомбинации, что позволяет исследовать генетические связи между породами и отслеживать как древние, так и относительно недавние эволюционные события. Изучение эволюции и демографической истории пород сельскохозяйственных животных становится возможным благодаря вовлечению в исследования исторических и археологических образцов. Цель нашей работы состояла в выявлении наиболее эффективного способа исследования мтДНК, извлеченной из археологических образцов, позволяющего проводить анализ популяционно-генетических параметров. В исследовании включены образцы, датированные концом XIII–XIV вв., обнаруженные при раскопках центральной части средневекового кремля в границах современного Ярославля. Для исследования материнской изменчивости крупного рогатого скота, разводившегося в лесной зоне Русской равнины, использованы методы полногеномного секвенирования и секвенирования фрагментов мтДНК по Сэнгеру. Дендрограмма на основе генетических дистанций полной митохондриальной последовательности по методу Neighbor–Joining выявила кластеризацию археологических образцов в группах современного ярославского и холмогорского скота, что может указывать на общих предков всех трех популяций. При подробном рассмотрении некоторых областей митогенома обнаружено, что для археологических образцов успешно генотипированными оказались последовательности, незначительно перекрывающиеся между собой, в связи с чем была разработана система генотипирования гиперварибельного участка D-петли с помощью секвенирования целевого фрагмента по Сэнгеру. Проведенный анализ нуклеотидного и гаплотипического разнообразия выявил в группе археологических образцов минимальные значения этих показателей. Построенная медианная сеть гаплотипов позволила отнести археологические образцы к гаплогруппе T3, наиболее распространенной в европейских породах скота. Анализ полученных данных позволяет предполагать происхождение изучаемых археологических образцов от особей местной группы скота, разводимой в окрестностях средневекового г. Ярославля в XIII–XIV вв.

**Ключевые слова:** митохондриальная ДНК, гаплогруппы, крупный рогатый скот, археологические образцы, древняя ДНК.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110041 **EDN:** WBLCGQ

Одомашнивание животных было важным шагом в демографическом и культурном развитии человечества. Вместе с окультуриванием растений

оно заложило основу сельского хозяйства, каким мы его знаем сегодня [1]. В ходе естественных эволюционных процессов и направленной селекции

сформировалось огромное разнообразие местных популяций. В течение последних десятилетий разработка и усиленное внимание к более эффективным программам селекции ускорили генетическое улучшение ряда пород.

В результате такой сельскохозяйственной практики высокопродуктивные породы вытеснили местные во всем мире [2, 3]. Такое развитие событий привело к растущей обеспокоенности по поводу эрозии генетических ресурсов [4, 5].

Эффективное управление генетическими ресурсами сельскохозяйственных животных (FAnGR) требует всесторонних знаний о характеристиках пород, включая данные о размере и структуре популяции, географическом распределении, производственной среде, а также внутривидовом и межвидовом генетическом разнообразии [6].

Получение новых знаний о геноме животных, совершенствование методических подходов, развитие высокопроизводительных технологий геномного анализа и создание современного аналитического оборудования сделали возможным использование различных генетических маркеров для идентификации и изучения аллелофондов [7].

На сегодняшний день одним из эффективных подходов к оценке генетического разнообразия является исследование полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК), которая демонстрирует высокий уровень изменчивости и характеризуется отсутствием рекомбинации, что позволяет исследовать генетические связи между породами и отслеживать как древние, так и относительно недавние эволюционные события [8–11].

Митохондриальный геном представляет собой одну кольцевую молекулу ДНК. Исключением являются некоторые кишечнополостные, водоросли, грибы и одноклеточные эукариоты, для которых характерна линейная структура мтДНК [12]. Для млекопитающих типичный размер митохондриального генома составляет 16–18 тпн. [13]. На протяжении тысячелетий проходило формирование митохондриального генома, который приобретал свои особенности, и согласно им образовались определенные гаплогруппы. Гаплогруппы — это одна из главных популяционно-генетических характеристик митогенома, используемых для определения происхождения скота. В мировой практике для крупного рогатого скота определены следующие шесть гаплогрупп — макрогруппа Т, которая включает в себя: Т, Т1, Т2, Т3, Т4, Т5 [14–16], I (*Bos indicus*) [17–19], Р (наиболее часто встречалась у ископаемых туров) [16, 20–22], Q (близка к гаплогруппе Т, возникла уже в процессе одомашнивания скота), R (далека от всех предшествующих гаплогрупп, в настоящее время встречается у итальянских пород скота) и E (отсутствует у современных животных) [21]. А для овец, основываясь

на анализе контрольной области мтДНК, исследователи идентифицировали семь гаплогрупп, две из которых (F и G) к настоящему времени исчезли, а пять (A, B, C, D, E) продолжают существовать в современных породах [23, 24].

Благодаря вовлечению в исследования исторических, археологических и ископаемых образцов становится возможным изучение эволюции и демографической истории пород сельскохозяйственных животных. Полученные данные могут быть использованы в качестве эталона при определении генофондного статуса современных популяций скота, а также для идентификации среди них особей — носителей уникальных аллелей или аллельных сочетаний, свойственных историческим образцам и отсутствующих у большинства животных современных популяций. Информация о генотипах исторических образцов может быть использована при проведении полногеномных ассоциативных исследований (genome wide association study, GWAS), а также при определении мишеней для геномного редактирования [25].

В качестве материала для такого рода исследований традиционно изучаются исторические черепа и их части, сохраняемые в музейных коллекциях [26, 27], а также полученные в ходе археологических исследований [28]. Вместе с тем использование черепов из краниологических коллекций в качестве источника ДНК осложняется тем, что их подготовка к депонированию включает ряд агрессивных химических воздействий, что приводит к существенной деградации нуклеиновых кислот. Особенно критично получение достаточного количества ядерной ДНК, представленной всего двумя копиями на клетку, в отличие от митохондриальной, количество копий которой в одной клетке составляет от 100 до 10000 [29]. Поэтому мы обратили внимание прежде всего на мтДНК и включили в исследование не только целые черепа, но и другие скелетные элементы (отдельные кости черепа, рога, зубы и метаподии).

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы выявить наиболее эффективный способ исследования митохондриальной ДНК, извлеченной из археологических образцов, позволяющий проводить анализ популяционно-генетических параметров.

В проведенной работе впервые в России для изучения археологических образцов средневекового крупного рогатого скота были использованы методы полногеномного секвенирования и секвенирования по Сэнгеру, которые показали свою эффективность при исследовании материнской изменчивости. Удалось дать оценку генетическому разнообразию и определить гаплотипическую принадлежность коров, содержащихся на территории средневекового Ярославля в XIII–XIV вв.



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены археологические образцы, полученные при раскопках на Волжской набережной в самом центре Ярославского кремля и датированные XIII–XIV вв. Выбранные в качестве образцов кости (фрагменты черепов, рога и пясти) происходят от взрослых особей, которые по размерным характеристикам несомненно относятся к разводимой в то время на территории центральной части Русской равнины местной популяции крупного рогатого скота [30–32]. Что касается половой принадлежности, то по морфологическим параметрам эти скелетные элементы были оценены как принадлежавшие коровам, что не противоречит данным секвенирования полного генома.

Исследование археологических образцов проводили в специализированной лаборатории ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, оборудованной для работы с древней ДНК [1].

В качестве материала для выделения ДНК был использован порошок, получаемый с помощью вибрационной шаровой мельницы MIXERMILL-MM 400 (Retsch GmbH, Германия) из фрагментов костей, предварительно очищенных от механических примесей, обработанных детергентом и ультрафиолетовым облучением для предотвращения контаминации образца экзогенной ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью набора COxDISExtractDecalcine (ООО «Гордис», Россия) в соответствии с инструкциями производителя с модификацией условий лизиса (56°C, на ночь) и объема растворов (2,5 объема лизирующего и промывающего буферов). Для оценки количественных характеристик ДНК проводили измерение концентрации двухцепочечной ДНК с использованием флуориметра Qubit™ (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, MA, США).

Исследование современных образцов проводили на базе ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Поскольку предварительные исследования показали сложность амплификации нуклеотидных последовательностей длиной более 400–500 пар нуклеотидов (п. н.) из археологических образцов, для получения последовательности полного митохондриального генома, насчитывающего более 16 тпн, было принято решение провести полногеномное секвенирование (Whole genome sequencing, WGS) археологических образцов и далее с помощью биоинформационных методов получить последовательность мтДНК.

Минимальное количество ДНК при создании библиотек для секвенирования составляет 3 мкг, поэтому пороговое значение концентрации препаратов получаемой ДНК было установлено на уровне 30 нг/мкл при объеме не менее 100 мкл. При получении ДНК более низкой концентрации

проводили повторное выделение ДНК с увеличением количества исходного материала, используемого для анализа, и/или концентрирование ДНК с использованием вакуумного центрифужного концентратора. В случаях отсутствия дополнительных навесок костного порошка, принимая во внимание уникальность исследуемых образцов, для создания библиотек использовались также образцы с количеством ДНК менее 1 мкг. Для таких образцов дополнительное концентрирование препаратов ДНК не проводилось.

Полногеномное секвенирование выполнялось на секвенаторе NovaSeq 6000 (2x 150 bp), библиотеки были подготовлены с использованием наборов TruSeqDNANanoLibraryPrepkit (Illumina) и Accel-NGS® 2SPlusDNALibraryKit (IDT).

Биоинформационная обработка данных проводилась в среде R с использованием дополнительных пакетов. Выравнивание сиквенсов выполняли с помощью инструментов bwa-mem2 [33] и SAMtools [34] на референсный геном крупного рогатого скота по сборке ARS\_UMD 3.1.1 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000003055.6/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003055.6/)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено полногеномное секвенирование 10 археологических образцов, после чего из полногеномных данных получены полные последовательности митохондриальной ДНК и проведена оценка качества выравнивания для этого участка последовательности (табл. 1).

Как видно из табл. 1, археологические образцы крупного рогатого скота характеризовались достаточно низким покрытием генома, что не противоречит аналогичным показателям в исследованиях для других видов животных и человека. В дальнейшем анализ были включены только шесть образцов, для которых покрытие митохондриального генома составляло более 30%.

На основании полных последовательностей была определена гаплогрупповая принадлежность для трех археологических образцов с наибольшим покрытием генома (выделены жирным шрифтом). В трех других образцах успешно секвенированные последовательности не попадали в области митогенома, позволяющие сделать однозначный вывод о гаплогрупповой принадлежности.

В качестве групп сравнения были использованы полные митохондриальные геномы современных представителей холмогорского, ярославского и голштинского скота, а также последовательности митогенома крупного рогатого скота, принадлежащие к разным гаплогруппам, загруженные из общедоступных источников (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Дополнительно были загружены митогеномы яков (*Bos grunniens*), овец (*Ovis aries*) и туров

**Таблица 1.** Характеристика исследуемых археологических образцов

Номер образца	Среднее количество ДНК в одной аликвоте, мкг	Средняя концентрация одной аликвоты, нг/мкл	% покрытия генома	Среднее покрытие генома
AR6	1.670	16.7	8.96	0.18
AR8	0.487	21.2	39.31	0.76
AR9	0.417	18.2	30.25	0.69
AR12	0.843	24.1	15.42	0.52
AR27	2.500	25.0	23.72	0.60
AR29*	0.096	3.1	54.45	8.55
AR32*	0.104	1.8	51.42	2.00
AR34	2.220	22.2	36.52	1.10
AR35*	0.597	10.3	17.12	0.64
AR38	1.650	16.5	41.64	0.97

Примечание. \* – не проводилось концентрирование раствора ДНК из нескольких аликвот. Курсивом выделены образцы, включенные в дальнейший анализ.

(*Bos primigenius*) для исключения неверной видовой идентификации костных останков.

С использованием программы MitoToolPy [35] была определена гаплогрупповая принадлежность исследуемых животных на основании набора данных из 153 полных последовательностей. Выявлено, что исследуемые археологические образцы принадлежат к гаплогруппе Т3, наиболее распространенной в Центральной Европе и на Балканах.

С использованием программы UGENE [36] построена дендрограмма на основании генетических дистанций по методу Neighbor-Joining (рис. 1) для археологических образцов и современных представителей холмогорской и ярославской пород.

Как видно из рис. 1, современные образцы холмогорской и ярославской пород в основном образуют группы в соответствии с породной принадлежностью. Археологические образцы AR8, AR9, AR38 расположились в кластерах современного ярославского скота. Образцы AR29, AR32, AR34 образовали единую группу с современными животными холмогорской породы.

Распределение средневековых образцов по кластерам холмогорской и ярославской пород может свидетельствовать о предковых компонентах, вероятнее всего, общих для группы северного европейского скота. Кроме того, при объяснении такого распределения необходимо учитывать предположение о существовании на территории древнерусского государства двух групп скота, что по археозоологическим данным маловероятно [30–32], а также направление современной селекционной работы для двух пород черно-пестрого корня, допускающее их взаимное скрещивание.

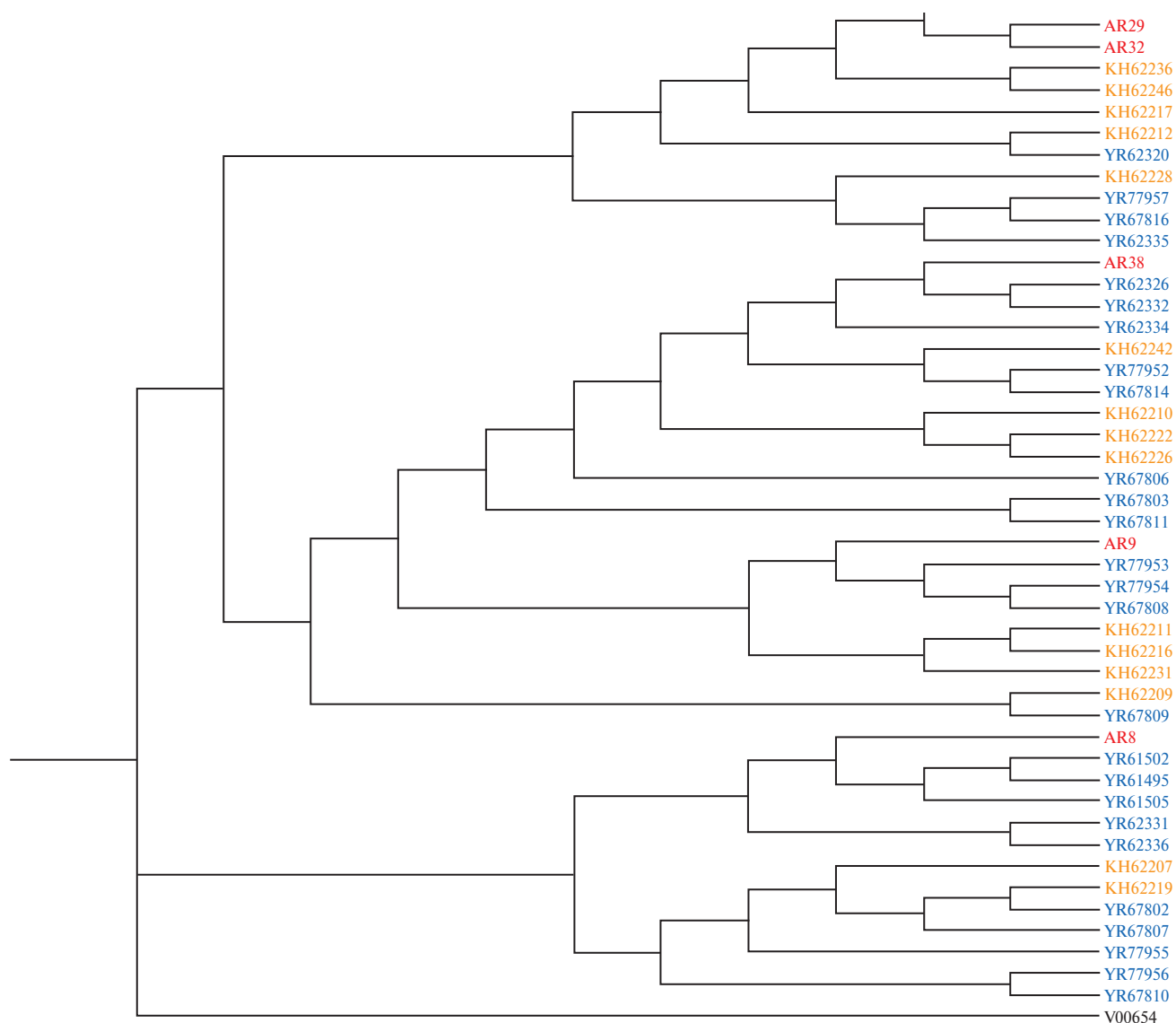
Поскольку у археологических образцов нуклеотидная последовательность была определена фрагментарно, дополнительно была исследована область D-петли как наиболее полиморфная часть митохондриального генома. Построена дендрограмма генетических дистанций для археологических образцов (AR) по отношению к современным представителям ярославской (YR) и холмогорской (KH) пород (рис. 2).

При анализе последовательностей D-петли образец AR29 показал значительное отличие от других образцов, сформировав длинную ветвь, в то время как другие образцы кластеризовались вблизи современных ярославских и холмогорских образцов.

Однако, поскольку для разных образцов в исследуемых областях генома успешно генотипированными оказались последовательности, значительно перекрывающиеся между собой, представленные данные следует интерпретировать с осторожностью. Надежные результаты могут быть получены при выполнении следующих условий: включение в выборку возможно большего количества образцов и успешное генотипирование одинаковых областей генома у этих образцов.

Поскольку генотипирование фрагментов ДНК длиной более 400–500 пн для археологических образцов сопряжено с трудностями ввиду сильной деградации ДНК, нами была разработана система генотипирования гипервариабельного участка D-петли длиной 375 пн с помощью ПЦР с последующим секвенированием целевого фрагмента по Сэнгеру.

Апробация разработанной тест-системы проведена на новых препаратах ДНК тех же образцов,



**Рис. 1.** Дендрограмма Neighbor–Joining на основании генетических дистанций полной митохондриальной последовательности крупного рогатого скота. AR – археологические образцы; современные образцы: YR – ярославская порода, KH – холмогорская порода.

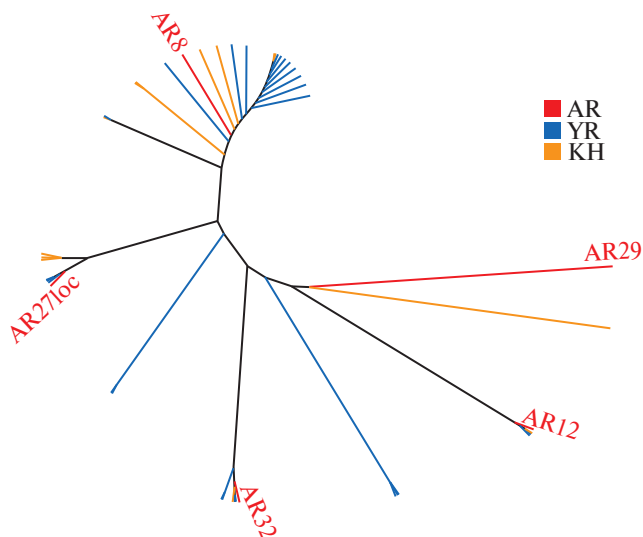
для которых ранее было проведено полногеномное секвенирование (AR9, AR12, AR29, AR32, AR35).

Нами был сформирован объединенный набор последовательностей короткого гипервариабельного участка мтДНК, полученных с помощью секвенирования по Сэнгеру пяти образцов (AR9, AR12, AR29, AR32, AR35) и одного образца AR8, извлеченных из полногеномных последовательностей.

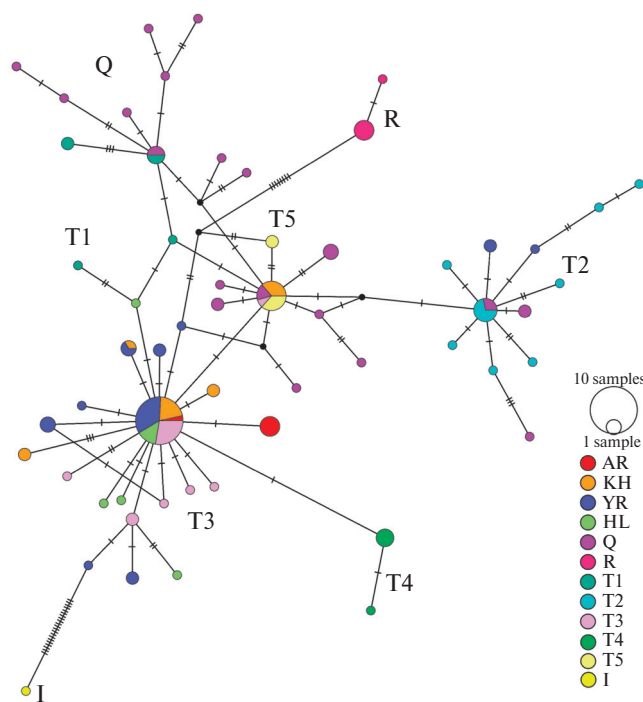
На объединенном наборе данных построена медианная сеть для археологических образцов в сравнении с современными холмогорскими и ярославскими образцами, а также с загруженными из общедоступных баз данных последовательностей с известными гаплогруппами (рис. 3).

Археологические образцы, как было показано на результатах полногеномных последовательностей, кластеризовались совместно с образцами, принадлежащими к гаплогруппе T3, к которой также относились большинство образцов современной ярославской, холмогорской и голштинской пород.

С использованием программы DnaSP 6.12.01 [37] был проведен анализ нуклеотидного и гаплогруппического разнообразия (табл. 2), который выявил минимальные значения показателей в группе археологических образцов ( $0,00119 \pm 0,00031$  и  $0,333 \pm 0,088$  соответственно). Стоит учитывать, что количество образцов в современной холмогорской породе почти в 3, а в ярославской – в 4 раза больше, чем в группе археологических образцов,



**Рис. 2.** Взаимосвязь археологических и современных образцов ярославской и холмогорской пород на основании анализа полиморфизма D-петли последовательности мтДНК. AR – археологические образцы; современные образцы: YR – ярославская порода, KH – холмогорская порода.



**Рис. 3.** Медианная сеть гаплотипов крупного рогатого скота на основании последовательности гипервариабельного участка D-петли.

что может влиять на расчет показателей разнообразия. Так, среднее число нуклеотидных различий и нуклеотидное разнообразие в современной холмогорской породе почти в 6, а в современной

ярославской – почти в 8 раз выше, чем у археологических образцов, в то время как показатель гаплотипического разнообразия возрос только в 2,7 раза для обеих современных пород. Таким образом, низкие показатели генетического разнообразия могут свидетельствовать об однородности исследуемой группы крупного рогатого скота с территории кремля Ярославля XIII–IV вв.

Результаты анализа дивергенции последовательностей мтДНК между парами исследуемых групп на основании количества сайтов, полиморфных только для одной группы из сравниваемой пары, приведены в табл. 3.

При попарном сравнении популяций в современной ярославской породе выявлено наибольшее количество полиморфных сайтов. Среди археологических образцов выявлен один сайт, который был полиморфным как по отношению к ярославской, так и по отношению к холмогорской породе. В современной ярославской популяции выявлено наибольшее количество полиморфных сайтов как по отношению к археологическим ( $n = 14$ ), так и по отношению к современным холмогорским ( $n = 11$ ) образцам. Таким образом, митогеном археологических образцов выглядит более консолидированным, чем у современных пород.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время значительная часть мировых генетических исследований древних образцов крупного рогатого скота с использованием митохондриальной ДНК направлена на уточнение истории происхождения и перемещения различных групп скота в процессе доместикации, а также предковых линий в местных породах и отродах.

По-видимому, наиболее полно исследованы широко распространенные популяции крупного рогатого скота тауринного типа макрогаплогруппы T. Изучение митохондриальной ДНК образцов крупного рогатого скота, датированных различными эпохами, выявило преобладание гаплогруппы T3 в европейских и ближневосточных популяциях [38]. Однако изучение археологических памятников, расположенных на территории северного Китая и Республики Бурятия, возрастом от позднего неолита до династий Цинь и Хань (примерно 2500 г. до н.э. – 350 г. н.э.), показало преобладание среди археологических образцов крупного рогатого скота с гаплогруппами T3, T2 и T4. Предполагается, что гаплогруппы T2, T3 и T4 распространялись в ходе торговых и военных взаимодействий между регионами Китая и народами Великой степи [39]. Исследование современных образцов турано-монгольского скота выявило преобладание опять же гаплогрупп T3, T4 и T2, однако у казахского и монгольского скота встречались гаплогруппа T1 и даже I, характерная для *B. indicus* [40].



**Таблица 2.** Показатели генетического разнообразия археологических и современных образцов крупного рогатого скота на основании анализа нуклеотидной последовательности гиперварибельного региона D-петли

Группа	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>h</i> ±SE	$\pi$ ±SE
AR	6	1	0.333	2	0.333 ± 0.088	0,00119 ± 0.00031
КН	15	10	2.190	8	0.905 ± 0.013	0,00709 ± 0.,00029
YR	25	17	2.727	12	0.917 ± 0.007	0.00882 ± 0.00024

Примечание. *n* – количество образцов; *S* – количество полиморфных сайтов; *K* – среднее число нуклеотидных различий; *H* – количество гаплотипов; *h* – гаплотипическое разнообразие;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие; SE – ошибка среднего.

**Таблица 3.** Оценка дивергенции последовательностей мтДНК при попарном сравнении пород

Группа 2	Группа 1		
	AR	КН	YR
AR		7	14
КН	1		11
YR	1	4	

Примечание. Над диагональю указано количество сайтов, полиморфных в первой группе, но мономорфных во второй. Под диагональю указано количество сайтов, полиморфных во второй группе, но мономорфных в первой.

Зафиксированные археозоологическими методами факты появления крупного рогатого скота на территории центральных лесных регионов Русской равнины относятся к эпохе бронзы (III тыс. до н.э.) и связаны с влиянием экономики западноевропейских племен культурного круга Шнуровой керамики и, вероятно, Триполья, а также миграциями носителей Ямной культурно-исторической общности из восточноевропейских степей [41–43]. Более поздние существенные перемещения домашних животных, в том числе коров, затронувшие южные рубежи лесной зоны, происходили уже с III по VII в. н.э. (Гуннское нашествие и период Великого переселения народов) и отличались более значительной протяженностью и географической разнонаправленностью. С достаточно большой вероятностью влияние на состав древнерусского стада могло происходить в X–XII вв. через экономические связи с государством Волжская Булгария, хозяйственная система которого имела явные юго-восточные традиции в скотоводческом секторе. По морфологическим характеристикам скелетных остатков изучаемого вида из археологических памятников городского и сельского типа древнерусский скот как местная породная группа лесной зоны сформировался еще в домонгольский период [30, 32, 44].

Таким образом, популяция крупного рогатого скота северо-восточной Руси могла иметь разные древние генетические корни – западные и восточные. Однако анализ митохондриального генома археологических образцов XIII–XIV вв. показал, что животные, содержащиеся на территории средневекового Ярославля, относились к группе тауринного скота, в частности к гаплогруппе T3. Более того, благодаря применению новых методических

подходов обнаружено значительное однообразие ярославских коров. Явных признаков присутствия генного материала популяций скота из восточной части Евразии в изучаемых образцах не обнаружено. Такие результаты хорошо соотносятся с археозоологическими представлениями о местных корнях этой популяции.

Однако для продолжения изучения митохондриального генома древнерусского скота и уточнения его вероятных генетических связей с современной ярославской породой нужны большие серии и включение в анализ других популяционно-генетических параметров.

Проведенные исследования показали, что полногеномное секвенирование с последующей биоинформационной обработкой данных дает возможность определить видовую и гаплогрупповую принадлежность археологических образцов, что позволит делать выводы о перемещении животных в результате торговли, военных действий или иных причин. Однако при анализе большого количества образцов или в случае, когда получение данных о ядерном геноме не входит в задачи исследования, полногеномное секвенирование целесообразнее заменить секвенированием по Сенгеру коротких целевых фрагментов.

Применение новых методических подходов к изучению археологических образцов из средневекового Ярославля позволило достаточно точно отнести их к группе тауринного скота, в частности к гаплогруппе T3, распространенной в Центральной Европе и на Ближнем Востоке. Отчасти была подтверждена также археозоологическая гипотеза о происхождении изучаемых образцов от особей

из популяции местного скота. Современные образцы ярославского скота показали генетическую близость к археологическим по некоторым кодирующим последовательностям и D-петле, что подтверждает общность происхождения и уникальность породы.

Исследования проведены в рамках выполнения работ по гранту РФФИ № 21-66-00007.

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, протокол № 5 от 17.07.2023.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Diamond J.* Evolution, consequences and future of plant and animal domestication // *Nature*. 2002. V. 418. P. 700–707.
2. *Notter D. R.* The importance of genetic diversity in livestock populations of the future // *J. Anim. Sci.* 1999. V. 77(1). P. 61–69. DOI: 10.2527/1999.77161x
3. *Ajmoné Mrsan P.* A global view of livestock biodiversity and conservation – GLOBALDIV // *Anim. Genet.* 2010. V. 41(s1). P. 1–5. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02036.x
4. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture / Eds edited by Scherf B. D. & Pilling D. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome? 2015. (available at <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>).
5. *Loftus R. T., Scherf B.* WorldWatchListfor Domestic Animal Diversity. FAO, Rome. 1993. P. 32–34.
6. *Groeneveld L. F., Lenstra J. A., Eding H. et al.* Genetic diversity in farm animals – a review // *Anim. Genet.* 2010. V. 41. P. 6–31. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02038.x
7. *Yang W., Kang X., Yang Q. et al.* Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity // *J. Anim. Sci. and Biotechnology*. 2013. V. 4. P. 2–6. DOI: 10.1186/2049-1891-4-2
8. *Сулимова Г. Е., Столповский Ю. А., Рузина М. Н., Захаров-Гезехус И. А.* Мониторинг генофондов популяций животных в связи с задачами селекции и изучения филогении // *Биоразнообразие и динамика генофондов*. М.: Наука, 2008. С. 211–214.
9. *Loftus R. T., MacHugh D. E., Bradley D. G. et al.* Evidence for two independent domestications of cattle // *PNAS USA*. 1994. V. 91(7). P. 2757–2761. DOI: 10.1073/pnas.91.7.2757
10. *Loftus R. T., MacHugh D. E., Ngere L. O. et al.* Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations // *Anim. Genet.* 1994. V. 25. P. 265–271. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1994.tb00203.x
11. *Bradley D. G., MacHugh D. E., Cunningham P., Loftus R. T.* Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle // *PNAS USA*. 1996. V. 93. P. 5131–5135. DOI: 10.1073/pnas.93.10.5131
12. *Burger G., Gray M. W., Lang B. F.* Mitochondrial genomes: Anything goes // *Trends in Genetics*. 2003/ V. 19. № 12. P. 709–716. doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012
13. *Frank K., Molnár J., Barta E., Marincs F.* The full mitochondrial genomes of Mangalica pig breeds and their possible origin // *Mitochondrial DNA Part B*. 2017. P. 730–734. DOI.org/10.1080/23802359.2017.1390415
14. *Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M. et al.* Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle // *Curr. Biol.* 2008. V. 18(4). P. 157–158. DOI: 10.1016/j.cub.2008.01.019
15. *Mannen H., Kohno M., Nagata Y. et al.* Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004. V. 32. P. 539–544. doi.org/10.1016/j.ympev.2004.01.010
16. *Troy C. S., MacHugh D. E., Bailey J. F. et al.* Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle // *Nature*. 2001. V. 410. P. 1088–1091. doi.org/10.1038/35074088
17. *Baig M., Beja-Pereira A., Mohammad R. et al.* Phylogeography and origin of Indian domestic cattle // *Curr. Science*. 2005. V. 89(1). P. 38–40.
18. *Chen S. Y., Lin B. Z., Baig M. et al.* Zebu cattle are an exclusive legacy of the South Asia Neolithic // *Mol. Biol. Evol.* 2010. V. 27. P. 1–6. doi.org/10.1093/molbev/msp213
19. *Magee D. A., Mannen H., Bradley D. G.* Duality in *Bos indicus* mtDNA diversity: Support for geographical complexity in zebu domestication // *The Evolution and History of Human Populations in South Asia: Inter-Disciplinary Studies in Archaeology, Biological Anthropology, Linguistics, and Genetics*. Dordrecht: Springer, 2007. P. 385–392. doi:10.1007/1-4020-5562-5
20. *Bailey J. F., Richards M. B., Macaulay V. A. et al.* Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species // *Proc. Biol. Sci.* 1996. V. 263. P. 1467–1473. doi.org/10.1098/rspb.1996.0214
21. *Edwards C. J., Bollongino R., Scheu A. et al.* Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs // *Proc. Biol. Sci.* 2007. V. 274. P. 1377–1385. doi.org/10.1098/rspb.2007.0020

22. *Stock F., Edwards C. J., Bollongino R. et al.* Cytochrome b sequences of ancient cattle and wild ox support phylogenetic complexity in the ancient and modern bovine populations // *Anim. Genet.* 2009. V. 40. № 5. P. 694–700. doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01905.x
23. *Dymova, M. A., Zadorozhny A. V., Mishukova O. V. et al.* Mitochondrial DNA analysis of ancient sheep from Altai // *Anim. Genet.* 2017. V. 48. № 5. P. 615–618. DOI:10.1111/age.12569
24. *Meadows J. R., Cemal I., Karaca O. et al.* Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East // *Genetics.* 2007. V. 175. № 3. P. 1371–1379. DOI:10.1534/genetics.106.068353
25. *Zinovieva N. A., Sermyagin A. A., Dotsev A. V. et al.* Animal genetic resources: Developing the research of allele pool of Russian cattle breeds – minireview // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. 2019. V. 54(4). P. 631–641. doi: 10.15389/agrobiology.2019.4.631eng
26. *Боронцекая О. И., Чукурова Е. А., Нукифоров А. И.* Возникновение и особенности породообразования, и практика сохранения белого паркового скота // *Известия ТСХА.* 2017. Т. 6. P. 68–84. DOI: 10.26897/0021-342X-2017-6-68-84
27. *Bro-Jørgensen M. H., Caroe C., Vieira F. G. et al.* Ancient DNA analysis of Scandinavian medieval drinking horns and the horn of the last aurochs bull // *J. Archaeol. Sci.* 2018. V. 99. P. 47–54. DOI: 10.1016/j.jas.2018.09.001
28. *Delsol N., Stucky B. J., Oswald J. A. et al.* Ancient DNA confirms diverse origins of early post-Columbian cattle in the Americas // *Sci. Rep.* 2023. V. 13(1). P. 12444. DOI: 10.1038/s41598-023-39518-3
29. *Robin E. D., Wong R.* Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells // *J. Cell. Physiol.* 1988. V. 136(3). P. 507–513. DOI: 10.1002/jcp.1041360316
30. *Цалкин В. И.* Материалы для истории скотоводства и охоты в Древней Руси // *Материалы и исследования по археологии СССР.* № 51. М.: Наука, 1956. 183 с.
31. *Антипина Е. Е., Лебедева Е. Ю.* Растения и животные. Глава 6 // *Археология древнего Ярославля: загадки и открытия.* 2-е изд., доп. и перераб. М.: ИА РАН, 2012. С. 144–229.
32. *Зиновьев А. В.* Крупный рогатый скот и лошади средневековой Твери (XII–XVI) // *Археология и история Пскова и Псковской земли. Семинар им. акад. В.В. Седова.* Вып. 30. М.: ИА РАН; СПб.: Нестор-История, 2015. С. 240–244.
33. *Vasimuddin M., Misra S., Li H., Aluru S.* Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems // *IEEE Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS).* 2019. DOI:10.1109/IPDPS.2019.00041
34. *Danecek P., Bonfield J. K., Liddle J. et al.* Twelve years of SAMtools and BCFtools // *Gigascience.* 2021. V. 10(2). DOI: 10.1093/gigascience/giab008
35. *Peng M. S., Fan L., Shi N. N. et al.* DomeTree: A canonical toolkit for mitochondrial DNA analyses in domesticated animals // *Mol. Ecol. Res.* 2015. V. 15(5). P. 1238–1242. DOI: 10.1111/1755-0998.12386
36. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. et al.* Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
37. *Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C. et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34 (12). P. 3299–3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
38. *Lenstra J.A., Ajmone-Marsan P., Beja-Pereira A. et al.* Meta-analysis of mitochondrial DNA reveals several population bottlenecks during worldwide migrations of cattle // *Diversity.* 2014. V. 6. P. 178–187. DOI:10.3390/d6010178
39. *Zhang N., Shao X., Guo Y. et al.* Ancient mitochondrial genomes provide new clues to the origin of domestic cattle in China // *Genes (Basel).* 2023. V. 14(7). DOI: 10.3390/genes14071313
40. *Xia X. T., Achilli A., Lenstra J. A. et al.* Mitochondrial genomes from modern and ancient Turano-Mongolian cattle reveal an ancient diversity of taurine maternal lineages in East Asia // *Heredity (Edinb).* 2021. V. 126(6). P. 1000–1008. DOI: 10.1038/s41437-021-00428-7
41. *Цалкин В. И.* Древнейшие домашние животные Восточной Европы // *Материалы и исследования по археологии СССР.* № 161. М.: Наука, 1970. 280 с.
42. *Антипина Е. Е., Лебедева Е. Ю.* Основные этапы развития комплексной производящей экономики в западной половине Евразии (от эпохи раннего металла до железного века) // *Мегаструктура Евразийского мира: основные этапы формирования: материалы Всероссийской научной конференции.* 2012. М.: ИА РАН, С. 72–76.
43. *Гак Е. И., Антипина Е. Е., Лебедева Е. Ю., Кайзер Э.* Хозяйственная модель поселения среднедонской катакомбной культуры Рыканы-3 // *Российская археология.* 2019. Вып. 2. С. 19–34.
44. *Антипина Е. Е., Яворская Л. В.* Археозоологические материалы из раскопок на территории Московского Кремля: хозяйственные и социальные аспекты повседневной жизни в XII–XVII вв. // *Древности Московского Кремля.* Т. 1. М.: ИА РАН, 2022. С. 309–325.

## Study of the Cattle Mitochondrial Genomes from Archaeological Finds on the Territory of Yaroslavl (XIII–XIV Centuries)

A. S. Abdelmanova<sup>1, \*</sup>, M. S. Fornara<sup>1</sup>, N. F. Bakoev<sup>1</sup>, E. E. Antipina<sup>1, 2</sup>,  
L. V. Yavorskaya<sup>1, 2</sup>, A. V. Dotsev<sup>1</sup>, N. A. Zinovieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moscow oblast, Podolsk, 142132, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Archaeology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117292 Russia*

\*e-mail: abdelmanova@vij.ru

Evolutionary processes and selective breeding have developed diverse arrays of local livestock populations adapted to specific natural and climatic conditions. Increased selection pressure and concentration on a few high-yielding breeds have led to the erosion of genetic resources worldwide. One effective approach to assessing genetic diversity is the study of mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism, which exhibits a high level of variability and is characterised by a lack of recombination, allowing the study of genetic relationships between breeds and the tracing of both ancient and relatively recent evolutionary events. The study of the evolution and demographic history of farm animal breeds is made possible by the involvement of historical and archaeological specimens in research. The aim of our work was to identify the most efficient way to investigate mitochondrial DNA extracted from archaeological samples, allowing the analysis of population genetic parameters. The study included samples dating from the late XIII–XIV centuries, discovered during excavations of the central part of the medieval Kremlin within the boundaries of modern Yaroslavl. The methods of full-genome sequencing and Sanger sequencing of mtDNA fragments were used to study the maternal variability of cattle bred in the forest zone of the Russian Plain. A dendrogram based on genetic distances of the complete mitochondrial sequence using the Neighbor-Joining method revealed clustering of archaeological samples in groups of modern Yaroslavl and Kholmogorsk cattle, which may indicate common ancestors of all three populations. A detailed examination of some regions of the mitogenome revealed that the archaeological samples were successfully genotyped with sequences that slightly overlapped with each other. Therefore, a system for genotyping the hypervariable region of the D-loop using Sanger sequencing of the target fragment was developed. The analysis of nucleotide and haplotypic diversity revealed minimal values of these parameters in the group of archaeological samples. The constructed median haplotype network allowed to attribute the archaeological samples to haplogroup T3, the most widespread in European cattle breeds. The analysis of the obtained data allows us to assume the origin of the studied archaeological specimens from individuals of the local group of cattle bred in the vicinity of medieval Yaroslavl in the XIII–XIV centuries.

**Keywords:** mitochondrial DNA, haplogroups, cattle, archaeological samples, ancient DNA.



УДК 577.17

## ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ НАСЕЛЕНИЯ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ. НАЦИОНАЛЬНЫЙ СОСТАВ

© 2024 г. К. Н. Сергеева<sup>1</sup>, С. Н. Сокорев<sup>1</sup>, Ю. И. Гончарова<sup>1</sup>,  
И. В. Батлуцкая<sup>1</sup>, И. Н. Сорокина<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

\*e-mail: Sorokina\_5@mail.ru

Поступила в редакцию 10.04.2024 г.

После доработки 19.05.2024 г.

Принята к публикации 27.05.2024 г.

Представлены результаты анализа динамики национальной принадлежности супругов Белгородской области с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг. Установлен достаточно однородный национальный состав с преобладанием русской национальности (более 90% как среди мужчин, так и среди женщин) во все временные периоды. За 130 лет несколько снизилась доля русской национальности (в 1.1 раза как среди мужчин, так и среди женщин) и увеличились доли украинцев (с 0.99 до 5.05% у мужчин и с 0.57 до 5.38% у женщин) и других национальностей (с 0 до 4.03% у мужчин и с 0.20 до 2.74% у женщин). Индекс этнической брачной ассортативности демонстрирует постоянство по русской национальности, стабильное снижение по украинской национальности (и в городе, и в селе), а по другим национальностям уменьшение для городского населения и увеличение — для сельского.

*Ключевые слова:* национальный состав, этническая брачная ассортативность.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110052 **EDN:** WBJMTJ

Важной составляющей популяционно-генетических исследований современного населения является изучение структуры национального состава и ее динамики. Активные миграционные процессы среди населения приводят к изменению брачно-демографических особенностей и национального состава популяций, увеличивая генетическое разнообразие. Неравномерность расселения этнических групп по территории приводит к подразделенности (стратификации) генофонда популяции. Как отмечает О. Л. Курбатова и соавт., «в терминах популяционной генетики, территориальная подразделенность популяции по генетически-значимому признаку, каковым является принадлежность к этнической группе, приводит к эффектам, аналогичным инбридингу» [1].

Многочисленные исследования, посвященные анализу национального состава современного населения, указывают на географическую и временную вариабельность данного показателя. Особенности национального состава установлены в Курской, Кемеровской областях, среди населения Якутии, Северного Кавказа, республик Казахстан, Карачаево-Черкесия, Северная Осетия, ряде городов России и др. [1–19]. Значимым фактором популяционной структуры является наличие

этнической брачной ассортативности среди населения, степень выраженности и динамика которой имеют особенности в различных этно-территориальных группах населения [2, 14, 16, 19].

Особую значимость данные исследования имеют для Центрального Черноземья, являющегося южной окраиной исконного ареала проживания русских. На формирование этнического состава региона, которое началось еще в XVI–XVII вв., значимое влияние оказывали как русский, так и украинский этносы. Регион заселялся за счет миграционного притока различных территориальных групп русских центральных губерний России и переселенцев Правобережной Украины [20]. Изменение этнического состава региона, долгое время являющегося биэтническим, происходило под влиянием множества факторов в различные периоды. Наиболее значимые изменения произошли на рубеже столетий.

Цель данной работы в связи с вышесказанным — изучение динамики национального состава населения Белгородского региона. Настоящее сообщение завершает серию работ [21–24] по изучению динамики популяционно-демографических показателей среди населения юга Центральной России.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом выступало население районных популяций Белгородской области: Белгородского, Грайворонского, Корочанского, Новооскольского, Старооскольского районов (уездов), которые входили в состав Курской губернии, затем Курской области, а после 1954 г. отошли к Белгородской области. Бирючанский (позже Красногвардейский и частично Алексеевский районы) и Валуйский районы (уезды) до 1954 г. входили в состав Воронежской губернии, затем Воронежской области, после 1954 г. являются районами Белгородской области. Критерии отбора и характеристики изучаемых районов изложены в ранее представленных работах [21, 22]. Анализ проводился за пять временных периодов: 1890–1910 гг. и 1951–1953 гг. – до момента образования Белгородской области в 1954 г. из части уездов Курской и Воронежской губерний и 1978–1980 гг., 1991–1993 гг. и 2016–2018 гг. после образования Белгородской области. В качестве источника информации о национальности супругов использовались записи церковно-приходских книг Архива ЗАГС Белгородской области конца XIX в. (1890–1910 гг.) – 4923 брачных записи, актов гражданского состояния областного архива ЗАГС за 1951–1953 гг. (5128 записей), 1978–1980 гг. (10991 запись), 1991–1993 гг. (4508 записей) и 2016–2018 гг. (5467 записей). Общий объем – 31017 записей. При изучении национального состава населения были выделены следующие группы: русские, украинцы и прочие национальности. Анализ проводился на районном уровне организации популяционной структуры [25]. Для оценки степени брачной ассортативности по национальности использовали коэффициент брачной ассортативности  $H$  [26]. При значении  $H = 0$  – популяция панмиксна,  $H > 1$  – положительная брачная ассортативность,  $H < 1$  – отрицательная брачная ассортативность. Для качественной оценки степени неслучайности образования брачного союза использовали модифицированный О.Л. Курбатовой индекс брачной ассортативности  $A'$  [3, 27, 28]. Значения индекса  $A'$  может изменяться от 0 при панмиксии до 100% в случае полной положительной брачной ассортативности. Обработка информации проводилась с использованием программ Excel (10), Statistica (v.10).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Национальный состав населения юга Центральной России*

1. 1890–1910 гг. Изучение национального состава населения уездов Курской и Воронежской губерний в 1890–1910 гг. показало достаточную однородность (табл. 1). Основной национальностью супругов являлась русская (мужчины – 99.02%, женщины – 99.42%) с незначительной

вариабельностью по районам. Доля лиц украинской национальности была незначительна (0.99% среди мужчин и 0.57% среди женщин) при вариабельности по уездам более 10 раз (11.78 раз у мужчин и 10.17 раз у женщин). Другие национальности встречались лишь среди женщин Курской губернии с частотой 0.2%. В среднем по уездам Воронежской губернии доля мужчин и женщин украинской национальности выше, чем в Курской губернии в 1.7 и 3.3 раза соответственно (см. табл. 1).

Значимых отличий в распределении мужчин и женщин русской национальности между городом и селом не установлено, тогда как доля мужчин украинской национальности была в среднем в 4 раза выше, чем аналогичный показатель среди женщин в городах, и в 1.4 раза в селах.

В конце XIX в. наблюдалась панмиксия среди жителей русской национальности без отличий среди городского и сельского населения ( $H = 0.999$ ) (см. табл. 1).

2. 1951–1953 гг. К середине XX в. в районах Курской и Воронежской областей сохранялась достаточная этническая однородность. При этом доля русской национальности (с незначительной вариабельностью по районам) несколько снизилась (среди мужчин на 4.8%, женщин на 4%). Доля супругов украинской национальности увеличилась (в 5.4 раза среди мужчин и 7.6 раз среди женщин) при вариабельности по районам более 5 раз (5.32 раза у мужчин и 6.70 раз у женщин). В среднем по районам Воронежской обл. доля и мужчин и женщин украинской национальности в 1.5 раза выше, чем в Курской обл. (табл. 2).

Значимых отличий в распределении супругов русской национальности между городом и селом не установлено, тогда как доля мужчин украинской национальности была в среднем в 1.4 раза выше, чем аналогичный показатель у женщин в городах и в 1.2 раза в селах. Другие национальности встречались в среднем с частотой менее 0.5%, чаще среди мужчин (в 1.4 раза), чем среди женщин, и преимущественно у городского населения (см. табл. 2).

Положительная брачная ассортативность по национальному признаку к середине XX в. была более выражена по сравнению с концом XIX в. без значимых различий между городом и селом (см. табл. 2).

3. 1978–1980 гг. Основной национальностью супругов в 1978–1980 гг. являлась русская (мужчины – 93.49%, женщины – 92.71%) с незначительной вариабельностью по районам (табл. 3). Доля украинской национальности достигала 5–6% (4.95% у мужчин и 6.08% у женщин) при вариабельности по районам более 5 раз (5.87 раза у мужчин и 5.39 раза у женщин). Другие национальности встречались в среднем с частотой более 1%, чаще у мужчин, чем у женщин (см. табл. 3).

Таблица 1. Национальный состав супругов Курской и Воронежской губерний в 1890—1910 гг.

Популяции	N	Мужчины						Женщины						$H_{рус} (A')$
		русские		украинские		другие		русские		украинские		другие		
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Уезды Курской губернии	Белгородский	843	99.41	5	0.59	—	—	841	99.76	1	0.12	1	0.12	0,999 (-0,60)
	— город	248	98.02	5	1.98	—	—	253	100.00	—	—	—	—	1 (-)
	— село	591	100.00	—	—	—	—	589	99.66	1	0.17	1	0.17	1 (-)
	Старооскольский	795	99.62	3	0.38	—	—	795	100.00	—	—	—	—	1 (-)
	— город	164	98.20	3	1.80	—	—	167	100.00	—	—	—	—	1 (-)
	— село	628	100.00	—	—	—	—	628	100.00	—	—	—	—	1 (-)
	Новооскольский	726	99.86	1	0.14	—	—	723	99.58	1	0.14	2	0.28	0,999 (-0,42)
	— город	302	100.00	—	—	—	—	301	99.67	—	—	1	0.33	1 (-)
	— село	424	99.76	1	0.24	—	—	422	99.52	1	0.24	1	0.24	0,999 (-0,47)
	Корочанский	364	98.35	6	1.65	—	—	363	99.73	—	—	1	0.27	0,999 (-1,68)
	— город	162	96.91	5	3.09	—	—	162	100.00	—	—	—	—	1 (-)
	— село	202	100.00	—	—	—	—	201	99.50	—	—	1	0.50	1 (100,00)
	Грайворонский	789	99.11	7	0.89	—	—	784	99.37	4	0.51	1	0.12	0,999 (-0,90)
	— город	320	99.38	2	0.62	—	—	319	99.69	1	0.31	—	—	0,999 (-0,63)
	— село	469	98.93	5	1.07	—	—	465	99.15	3	0.64	1	0.21	0,999 (-1,08)
<b>В среднем по губернии</b>	<b>703</b>	<b>99.27</b>	<b>4</b>	<b>0.73</b>	—	—	<b>701</b>	<b>99.69</b>	<b>2</b>	<b>0.26</b>	<b>1</b>	<b>0.20</b>	<b>0,999 (-0,720)</b>	
— город	240	98.50	4	1.87	—	—	240	99.87	1	0.31	1	0.33	0,999 (-0,126)	
— село	463	99.74	3	0.66	—	—	461	99.57	2	0.35	1	0.28	0,999 (19,69)	
Уезды Воронежской губернии	Валуийский	820	98.54	12	1.46	—	—	810	98.78	10	1.22	—	—	1 (8,66)
	— город	190	97.89	4	2.11	—	—	189	99.47	1	0.53	—	—	0,999 (-2,15)
	— село	630	98.73	8	1.27	—	—	621	98.57	9	1.43	—	—	1 (11,23)
	Бирючанский	586	98.98	6	1.02	—	—	583	99.49	3	0.51	—	—	0,999 (-1,03)
	— город	259	98.84	3	1.16	—	—	259	100.00	—	—	—	—	1 (-)
	— село	327	99.07	3	0.93	—	—	324	99.61	3	0.39	—	—	0,999 (-0,93)
	<b>В среднем по губернии</b>	<b>703</b>	<b>98.76</b>	<b>9</b>	<b>1.24</b>	—	—	<b>697</b>	<b>99.14</b>	<b>7</b>	<b>0.87</b>	—	—	<b>0,999 (3,815)</b>
	— город	225	98.37	4	1.64	—	—	224	99.74	1	0.53	—	—	<b>0,999 (-1,075)</b>
	— село	478	98.90	6	1.11	—	—	473	99.09	6	0.91	—	—	<b>0,999 (5,150)</b>
	<b>В среднем по региону</b>	<b>704</b>	<b>99.02</b>	<b>7</b>	<b>0.99</b>	—	—	—	<b>99.42</b>	<b>5</b>	<b>0.57</b>	<b>1</b>	<b>0.20</b>	<b>0,999 (0,576)</b>
	— город	236	98.44	5	1.76	—	—	—	<b>99.81</b>	<b>1</b>	<b>0.42</b>	<b>1</b>	<b>0.33</b>	<b>0,999 (-0,397)</b>
	— село	467	99.32	5	0.89	—	—	—	<b>99.33</b>	<b>4</b>	<b>0.63</b>	<b>1</b>	<b>0.28</b>	<b>0,999 (15,536)</b>

Примечание. N — коэффициент брачной ассортативности; A' — индекс брачной ассортативности.

Таблица 2. Национальный состав супругов Курской и Воронежской областей в 1951–1953 гг.

Популяции	N	Мужчины						Женщины						N <sub>рус</sub> (A')		
		русские		украинцы		другие		русские		украинцы		другие		рус.	укр.	др.
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Белгородский	1170	1108	94.70	51	4.36	11	0.94	1129	96.50	37	3.16	4	0.34	1.01 (15.01)	3.10 (9.57)	53.20 (49.53)
– город	404	366	90.59	31	7.67	7	1.74	379	93.81	21	5.20	4	0.99	1.01 (16.11)	1.90 (7.16)	28.90 (49.12)
– село	766	742	96.87	20	2.61	4	0.52	750	97.91	16	2.09	–	–	1.00 (9.67)	4.80 (10.15)	– (–)
Старооскольский	675	659	97.63	14	2.07	2	0.30	663	98.22	10	1.48	2	0.30	1.00 (23.18)	14.5 (28.52)	– (–0.30)
– город	197	192	97.49	4	2.03	1	0.48	191	96.95	4	2.03	2	1.02	1.01 (38.12)	24.6 (48.96)	– (–1.03)
– село	478	467	97.70	10	2.09	1	0.21	472	98.75	6	1.25	–	–	1.00 (14.70)	8.00 (14.89)	– (–)
Новооскольский	645	570	88.37	71	11.01	4	0.62	574	88.99	64	9.92	7	1.09	1.09 (69.72)	6.70 (70.15)	23.00 (24.18)
– город	102	94	92.16	7	6.86	1	0.98	97	95.10	3	2.94	2	1.96	1.03 (56.60)	9.70 (64.21)	– (–2.00)
– село	543	476	87.66	64	11.78	3	0.56	477	87.84	61	11.23	5	0.93	1.10 (70.62)	6.30 (70.27)	36.20 (32.71)
Корочанский	633	613	97.15	16	2.53	2	0.32	619	98.10	12	1.90	–	–	1.01 (39.95)	16.40 (40.15)	– (–)
– город	156	150	97.40	2	1.30	2	1.30	152	98.70	2	1.30	–	–	0.99 (–2.67)	– (–1.32)	– (–)
– село	477	463	97.06	14	2.94	–	–	467	97.90	10	2.10	–	–	1.01 (48.49)	17 (48.49)	– (–)
Грайворонский	643	616	95.80	22	3.42	5	0.78	623	96.89	17	2.64	3	0.47	1.01 (47.81)	13.75 (45.18)	214.30 (66.41)
– город	112	102	91.07	6	5.36	4	3.57	102	91.07	8	7.14	2	1.79	1.03 (34.12)	4.70 (28.21)	56.00 (100.0)
– село	531	514	96.80	16	3.01	1	0.19	521	98.12	9	1.70	1	0.18	1.01 (58.68)	22.1 (65.63)	– (–0.19)

Районы Курской области



Таблица 2. Окончание

Популяции	N	Мужчины						Женщины						$H_{рус} (A')$		
		русские		украинцы		другие		русские		украинцы		другие		рус.	укр.	др.
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
<i>В среднем по области</i>	753	713	94.73	35	4.68	5	0.59	722	95.74	28	3.82	3	0.44	1.02 (39.13)	10.89 (38.71)	58.10 (27.96)
— город	194	181	93.74	10	4.64	3	1.61	184	95.13	8	3.72	2	1.15	1.01 (28.46)	8.18 (29.44)	16.98 (29.22)
— село	559	532	95.22	25	4.49	2	0.30	537	96.10	20	3.67	1	0.22	1.02 (40.43)	11.64 (41.89)	7.24 (6.50)
Валуйский	724	681	94.06	43	5.94	—	—	682	94.20	41	5.66	1	0.14	1.02 (31.66)	6.20 (32.58)	— (—)
— город	193	183	94.82	10	5.18	—	—	187	96.89	5	2.59	1	0.52	1.01 (29.69)	7.70 (36.72)	— (—)
— село	531	498	93.78	33	6.21	—	—	495	93.22	36	6.78	—	—	1.02 (34.99)	5.80 (34.99)	— (—)
Алексеевский	638	586	91.85	50	7.84	2	0.31	602	94.36	36	5.64	—	—	1.05 (78.83)	10.30 (78.90)	— (—)
— город	295	279	94.58	14	4.75	2	0.67	289	97.97	6	2.03	—	—	1.00 (11.89)	3.50 (12.52)	— (—)
— село	343	307	89.50	36	10.50	—	—	313	91.25	30	8.75	—	—	1.09 (92.55)	8.90 (92.55)	— (—)
<i>В среднем по области</i>	681	634	92.96	47	6.89	1	0.16	642	94.28	39	5.65	1	0.07	1.04 (55.25)	8.25 (55.74)	— (—)
— город	244	231	94.70	12	4.97	1	0.34	238	97.43	6	2.31	1	0.26	1.01 (20.79)	5.6 (24.62)	— (—)
— село	437	403	91.64	35	8.36	—	—	404	92.24	33	7.77	—	0.00	1.06 (63.77)	7.35 (63.77)	— (—)
<i>В среднем по региону</i>	733	690	94.22	38	5.31	4	0.47	699	95.32	31	4.34	2	0.33	1.03 (43.74)	10.14 (43.58)	41.50 (19.97)
— город	208	195	94.02	11	4.74	2	1.25	200	95.78	7	3.32	2	0.90	1.01 (26.27)	7.44 (28.07)	12.13 (20.87)
— село	524	495	94.20	28	5.59	1	0.21	499	95.00	24	4.84	1	0.16	1.03 (47.10)	10.41 (48.14)	5.17 (4.65)

Примечание.  $N$  — коэффициент брачной ассортативности;  $A'$  — индекс брачной ассортативности.

Таблица 3. Национальный состав супругов Белгородской области в 1978–1980 гг.

Популяции	N	Мужчины						Женщины						N <sub>рус</sub> (A')		
		русские		украинцы		другие		русские		украинцы		другие		рус.	укр.	др.
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Белгородский район	4737	4246	89.63	285	6.02	206	4.35	4395	92.78	279	5.89	63	1.33	1.01 (12.90)	2.32 (8.47)	3.65 (12.05)
– город	3378	3027	89.61	176	5.21	175	5.18	3154	93.37	177	5.24	47	1.39	1.01 (14.81)	2.49 (8.26)	3.29 (12.49)
– село	1359	1219	89.70	109	8.02	31	2.28	1241	91.32	102	7.50	16	1.18	1.01 (9.30)	1.96 (8.33)	8.22 (16.85)
Старооскольский район	3315	3043	91.79	166	5.01	106	3.20	3067	92.52	150	4.52	98	2.96	1.01 (13.02)	3.99 (15.78)	3.83 (9.35)
– город	2165	1933	89.33	140	6.47	91	4.20	1962	90.67	118	5.45	84	3.88	1.01 (11.33)	3.14 (14.83)	3.11 (9.28)
– село	1155	1110	96.44	26	2.26	15	1.30	1105	96.00	32	2.78	14	1.22	1.01 (16.16)	8.30 (20.88)	5.48 (5.92)
Новооскольский район	1120	1018	90.87	92	8.24	10	0.89	1011	90.24	100	8.95	9	0.81	1.03 (33.73)	4.61 (35.53)	24.82 (21.52)
Корочанский район	1034	982	94.97	44	4.26	8	0.77	981	94.87	47	4.55	6	0.58	1.01 (18.92)	4.00 (14.29)	21.54 (16.02)
Грайворонский район	613	590	96.25	18	2.94	5	0.81	553	90.21	49	7.99	11	1.80	1.00 (8.43)	2.09 (9.43)	11.15 (18.54)
Валуйский район	1837	1765	96.08	54	2.94	18	0.98	1703	92.71	117	6.37	17	0.92	1.01 (11.61)	2.91 (12.98)	13.61 (16.83)
Красногвардейский район	1145	1123	98.08	17	1.48	5	0.44	1122	97.99	19	1.66	4	0.35	0.99 (–2.05)	0.00 (–1.69)	0.00 (–0.44)
Алексеевский район	1013	914	90.22	88	8.69	11	1.09	915	90.33	88	8.69	10	0.98	1.04 (41.19)	5.49 (42.75)	18.42 (140.44)
<i>В среднем по области</i>	<b>1852</b>	<b>1710</b>	<b>93.49</b>	<b>96</b>	<b>4.95</b>	<b>46</b>	<b>1.57</b>	<b>1718</b>	<b>92.71</b>	<b>106</b>	<b>6.08</b>	<b>27</b>	<b>1.22</b>	<b>1.01</b> <b>(17.22)</b>	<b>3.18</b> <b>(17.19)</b>	<b>12.75</b> <b>(29.29)</b>
– город	2772	2480	89.47	158	5.84	133	4.69	2558	92.02	148	5.35	66	2.64	1.01 (13.07)	2.82 (11.55)	3.20 (10.89)
– село	1257	1165	93.07	68	5.14	23	1.79	1173	93.66	67	5.14	15	1.20	1.01 (12.73)	5.13 (14.61)	6.85 (11.39)

Примечание. N – коэффициент брачной ассортативности; A' – индекс брачной ассортативности.

Таблица 4. Национальный состав супругов Белгородской области в 1991–1993 гг.

Популяции	N	Мужчины						Женщины						H <sub>рус</sub> (A')		
		русские		украинцы		другие		русские		украинцы		другие		рус.	укр.	др.
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Белгородский район	1654	1495	90.39	102	6.17	57	3.44	1528	92.38	96	5.80	30	1.82	1.01 (11.32)	1.35 (2.31)	8.71 (27.50)
– город	1350	1223	90.59	78	5.78	49	3.63	1260	93.33	66	4.89	24	1.78	1.01 (12.92)	0.79 (1.91)	6.89 (22.18)
– село	304	272	89.47	24	7.90	8	2.63	268	88.16	30	9.87	6	1.97	1.01 (7.84)	1.27 (2.92)	19.0 (48.65)
Старооскольский район	1052	962	91.44	45	4.28	45	4.28	986	93.73	41	3.90	25	2.37	1.00 (7.21)	2.85 (8.27)	1.87 (12.25)
– город	665	593	89.17	32	4.81	40	6.02	619	93.08	24	3.61	22	3.31	1.01 (9.80)	3.46 (12.45)	3.02 (22.62)
– село	387	369	95.35	13	3.36	5	1.29	367	94.83	17	4.39	3	0.78	1.00 (0.41)	1.50 (3.45)	0.00 (–1.31)
Новооскольский район	408	356	87.25	35	8.58	17	4.17	361	88.48	33	8.09	14	3.43	1.03 (24.41)	2.12 (10.50)	17.14 (70.19)
Корочанский район	479	411	85.80	30	6.26	38	7.94	408	85.18	39	8.14	32	6.68	1.08 (46.48)	4.09 (27.42)	8.27 (18.54)
Грайворонский район	310	279	90.00	18	5.81	13	4.19	252	81.29	27	8.71	31	10.00	1.04 (36.80)	3.19 (20.89)	15.33 (67.78)
Валуйский район	893	844	94.51	28	3.14	21	2.35	821	91.94	48	5.38	24	2.68	1.01 (13.43)	0.00 (–5.68)	17.72 (46.17)
Красногвардейский район	620	597	96.29	6	0.97	17	2.74	582	93.87	25	4.03	13	2.10	1.01 (30.79)	8.27 (30.53)	19.64 (52.55)
Алексеевский район	712	614	86.24	80	11.24	18	2.52	623	87.50	68	9.55	21	2.95	1.06 (41.37)	3.80 (35.39)	26.37 (77.10)
<i>В среднем по области</i>	<b>766</b>	<b>695</b>	<b>90.24</b>	<b>43</b>	<b>5.81</b>	<b>28</b>	<b>3.95</b>	<b>695</b>	<b>89.30</b>	<b>47</b>	<b>6.70</b>	<b>24</b>	<b>4.00</b>	<b>1.03</b> <b>(26.48)</b>	<b>3.21</b> <b>(16.20)</b>	<b>14.38</b> <b>(46.51)</b>
– город	1008	908	89.88	55	5.30	45	4.83	940	93.21	45	4.25	23	2.55	1.01 (11.36)	2.13 (7.18)	4.96 (22.40)
– село	346	321	92.41	19	5.63	7	2.00	318	91.50	24	7.13	5	1.38	1.01 (4.13)	1.39 (3.19)	9.50 (23.67)

Примечание. N – коэффициент брачной ассортативности; A' – индекс брачной ассортативности.

Таблица 5. Национальный состав супругов Белгородской области в 2016–2018 гг.

Популяции	N	Мужчины						Женщины						H (A')		
		русские		украинцы		другие		русские		украинцы		другие		рус.	укр.	др.
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
Белгородский район	2001	1859	92.90	70	3.50	72	3.60	1897	94.80	70	3.50	34	1.70	1.01 (11.17)	4.08 (11.18)	4.84 (15.13)
– город	1009	924	91.57	35	3.47	50	4.96	961	95.24	32	3.17	16	1.59	1.01 (15.83)	5.41 (15.83)	5.05 (21.09)
– село	991	934	94.25	35	3.53	22	2.22	936	94.45	38	3.83	17	1.72	1.00 (7.4)	2.98 (7.9)	5.30 (9.76)
Старооскольский район	1952	1744	89.34	88	4.51	120	6.15	1793	91.85	72	3.69	87	4.46	1.01 (7.08)	3.39 (11.28)	1.87 (5.70)
Новооскольский район	519	477	91.83	25	4.86	17	3.31	488	93.97	24	4.67	7	1.36	1.00 (5.15)	0.86 (-0.73)	4.32 (11.35)
Корочанский район	448	410	91.52	11	2.46	27	6.02	423	94.42	13	2.90	12	2.68	1.01 (47.55)	12.53 (34.46)	12.44 (73.40)
Грайворонский район	411	339	82.48	46	11.19	26	6.33	331	80.54	56	13.63	24	5.83	1.02 (10.32)	1.76 (11.91)	2.64 (11.04)
Валуйский район	1225	1138	92.97	62	5.06	24	1.97	1124	91.76	74	6.04	26	2.2	1.01 (18.96)	2.40 (9.02)	9.81 (19.12)
Красногвардейский район	656	600	91.45	37	5.63	19	2.92	600	91.45	39	5.95	17	2.60	1.02 (78.52)	2.40 (8.86)	14.68 (45.31)
Алексеевский район	911	865	94.95	29	3.18	17	1.87	877	96.27	24	2.63	10	1.10	1.01 (25.66)	5.24 (13.93)	32.15 (59.24)
В среднем по области	1015	929	90.93	46	5.05	41	4.03	942	91.88	47	5.38	27	2.74	1.01 (25.55)	4.08 (12.49)	10.34 (30.06)

Примечание. H – коэффициент брачной ассортативности; A' – индекс брачной ассортативности.



Значимых отличий в распределении мужчин и женщин русской и украинской национальностей между городом и селом не установлено. Другие национальности встречались в среднем чаще у мужчин (в 2.2 раза), чем у женщин, и преимущественно в городской части популяции (см. табл. 3).

Этническая брачная ассортативность несколько снизилась к 1978–1980 гг. и была более выраженной у сельского населения (см. табл. 3).

4. 1991–1993 гг. К концу XX в. население Белгородского региона сохранило достаточную однородность национального состава. Несмотря на незначительное снижение доли русской национальности (на 3.25% у мужчин и на 3.41% у женщин), она осталась преобладающей среди супругов с незначительной вариабельностью по районам (табл. 4). Доля лиц украинской национальности увеличилась незначительно (менее 1%), составив 5.81% у мужчин и 6.70% у женщин при выраженной вариабельности по районам (11.6 раза для мужчин и 2.5 раза для женщин). Доля других национальностей возросла в 2.5 раза среди женихов и в 3.3 раза среди невест, встречаясь в среднем с частотой 4% как у мужчин, так и у женщин с большей вариабельностью среди женщин (в 1.5 раза), особенно в сельской местности (см. табл. 4).

В городской и сельской частях популяции не было установлено значимых отличий в распределении мужчин и женщин русской национальности. Доля женихов украинской национальности в городах и селах не отличалась, а невест — была в 1.7 раза выше в селах. Другие национальности чаще встречались в городах, чем в селах, как у мужчин (2.4 раза), так и у женщин (1.9 раза) (см. табл. 4).

К концу XX в. сохранилась положительная брачная ассортативность по национальному признаку во всех исследуемых популяциях, более выраженная по украинской национальности у городских

жителей, а по другим национальностям — у сельских (см. табл. 4).

5. 2016–2018 гг. В 2016–2018 гг. в восьми районах Белгородской области основной национальностью супругов являлась русская (мужчины — 90.93%, женщины — 91.88%) с незначительной вариабельностью по районам (табл. 5). Доля лиц украинской национальности составляла порядка 5% (5.05% у мужчин и 5.38% у женщин) при значительной вариабельности по районам (мужчины — 4.5 раза, женщины — 4.7 раза). Другие национальности встречались в среднем с частотой менее 5%, чаще у мужчин.

Значимых отличий в распределении русской и украинской национальностей супругов между городом и селом не установлено. Другие национальности у женихов чаще встречались в городе (2.2 раза), чем в селе, у невест различий не наблюдалось (см. табл. 5).

К началу XXI в. сохранилась положительная брачная ассортативность по национальному признаку во всех исследуемых популяциях, более выраженная по украинской национальности в городах (см. табл. 5).

#### *Тенденции динамики национального состава населения юга Центральной России*

В ходе анализа динамики национального состава супругов с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг. в разрезе пяти временных периодов выявлены следующие тенденции.

Во-первых, основной национальностью супругов юга Центральной России в течение 130 лет являлась русская национальность, на долю которой приходилось около 90% как у мужчин, так и у женщин (рис. 1).

Во-вторых, за XX в. снизилась доля русского населения (мужчины с 99.02 до 90.93%, женщины с

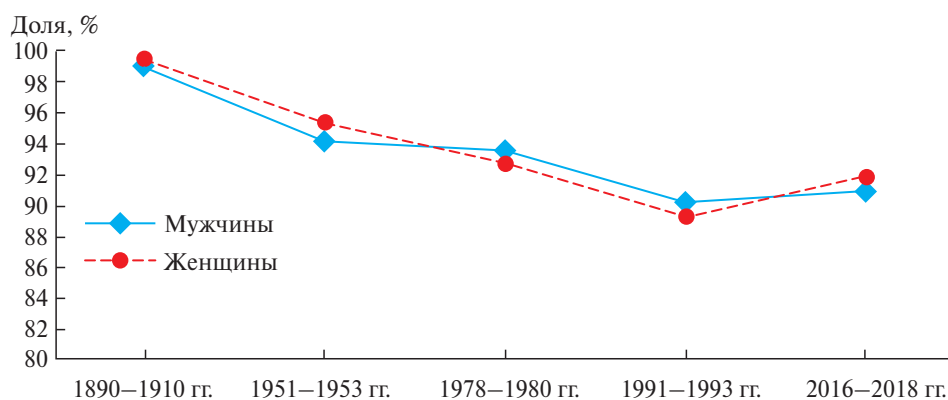


Рис. 1. Динамика удельного веса супругов русской национальности Белгородской области.

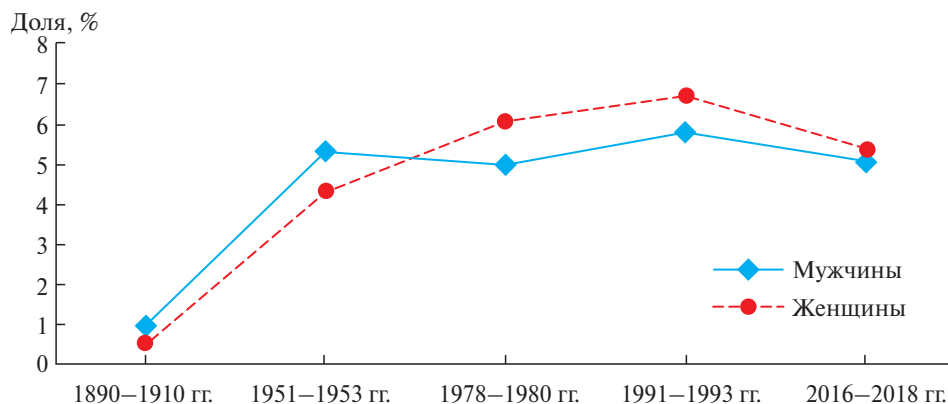


Рис. 2. Динамика удельного веса супругов украинской национальности Белгородской области.

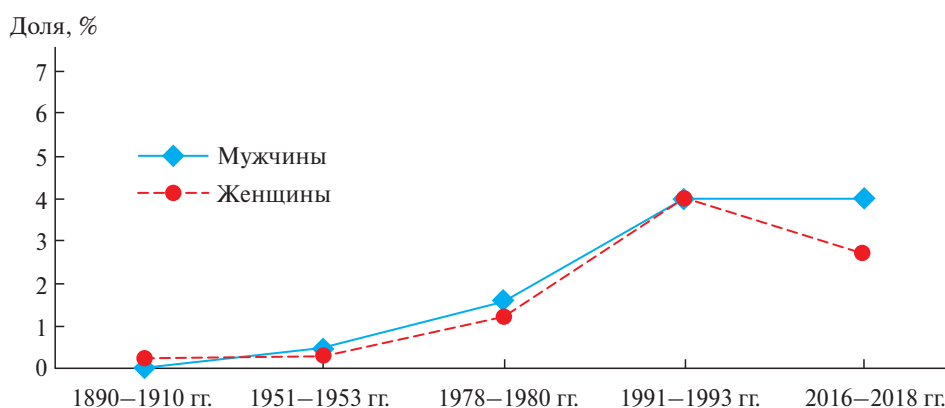


Рис. 3. Динамика удельного веса супругов других национальностей Белгородской области.

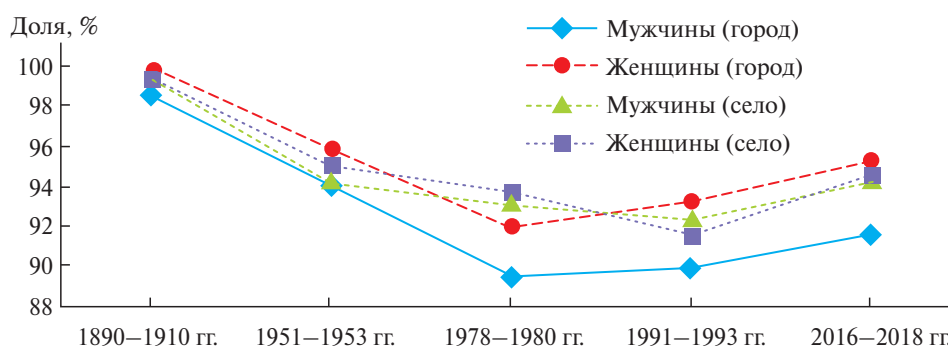


Рис. 4. Динамика удельного веса русской национальности городского и сельского населения Белгородской области.

99.42 до 91.88%) (см. рис. 1) и увеличился удельный вес украинцев (мужчины в 5 раз, женщины в 9.4 раза) (рис. 2) и лиц других национальностей, особенно среди женщин (мужчины в 4 раза, женщины в 13.7 раза) (рис. 3).

В-третьих, значимых отличий в динамике мужчин и женщин русской национальности между городом и селом не установлено (рис. 4). Тогда как

доля женщин украинской национальности с 1890 г. по 2018 г. увеличилась в среднем в 7.5 раза в городе и в 6 раз в селе, а у мужчин украинской национальности бо́льший рост наблюдался в селе (в среднем в 4 раза), чем в городе (в среднем в 2 раза) (рис. 5).

В-четвертых, за анализируемый период наблюдался рост доли других национальностей (кроме русской и украинской): у женщин как в городе (в 5

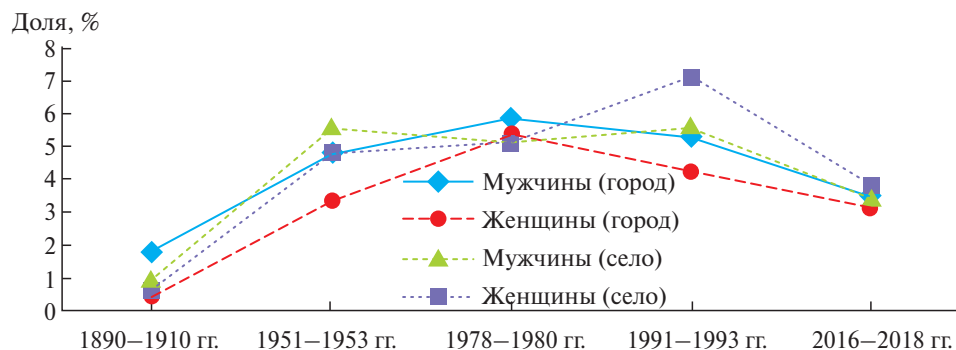


Рис. 5. Динамика удельного веса украинской национальности городского и сельского населения Белгородской области.

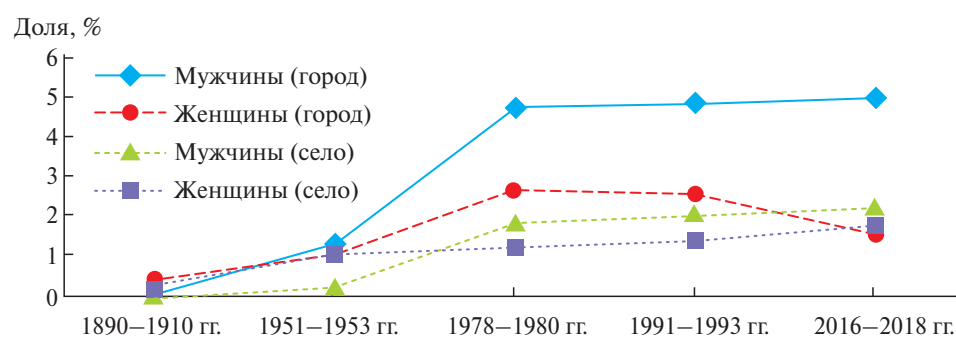


Рис. 6. Динамика удельного веса других национальностей городского и сельского населения Белгородской области.

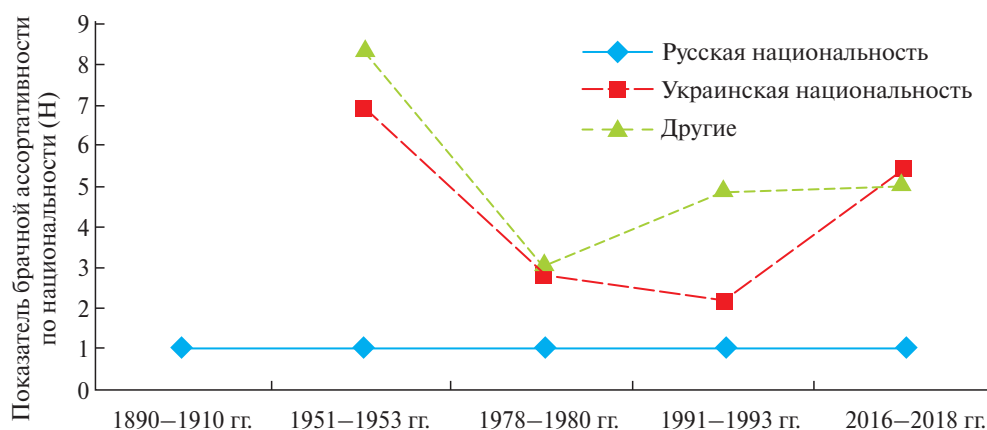


Рис. 7. Динамика показателя этнической брачной ассортативности городской части белгородской популяции.

раз), так и в селе (в 6 раз); у мужчин более интенсивный рост в городе (в 5 раз), чем в селе (в 2 раза) (рис. 6).

В-пятых, наблюдалась положительная брачная ассортативность по русской национальности без отличий между городом (рис. 7) и селом (рис. 8) во все исследуемые периоды. Брачная избирательность по украинской национальности снизилась в целом за 130 лет (и в городе, и в селе), а по другим

национальностям уменьшилась в целом в городах, но увеличилась в селах (рис. 7, 8).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами в ходе популяционно-демографического исследования сведения о национальном составе супругов Белгородского региона в разрезе пяти временных периодов отражают

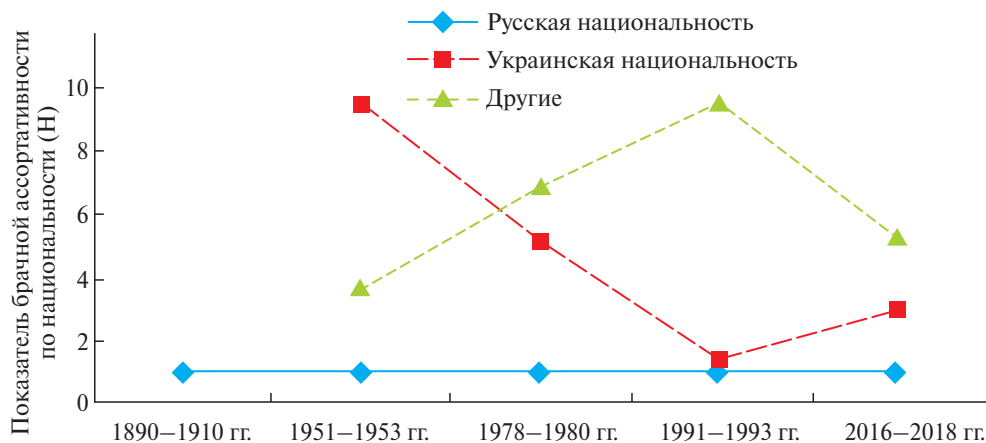


Рис. 8. Динамика показателя этнической брачной ассортативности сельской части белгородской популяции.

исторические процессы предыдущих десятилетий. Формирование этнического состава Белгородской области — сложный исторический процесс, который своими корнями уходит на глубину XVI–XVII вв. Это был период освоения южных границ России и заселения данных территорий жителями из Центральной России и Правобережной Украины, известный как колонизация малозаселенных земель «Поля» великорусами и малорусами. В результате совместного переселения в конце XVII в. образовались обширные территории украинских и русских поселений с сохранением языковых и культурных традиций в Курской и Воронежской губерниях [29]. С начала заселения и до 1930-х гг. данная территория была преимущественно заселена русскими и украинцами. Остальные этнические группы на рубеже XIX–XX вв. составляли мене 0.5% [20, 30], что соответствует полученным нами результатам. Однако ассимиляции русского и украинского населения практически не происходило, за исключением городов-крепостей, вплоть до периода индустриализации и урбанизации 1960–1970 гг. Как отмечали А.И. Дудка и И.Г. Оноприенко [31]: «Стремясь сохранить свои традиции и передать культурный опыт следующим поколениям соотечественников, они [русские и украинцы — прим. авт.] стремились заключать браки внутри своих этнических групп». На 1926 г. (по данным переписи) русские занимали г. Белгород и в основном северную часть современной Белгородской области — это территории современных Ивнянского, частично Прохоровского, Старооскольского, Корочанского, частично Новооскольского районов. Максимальная доля украинцев отмечалась в приграничье с Украиной — это территория современных Ровеньского, Алексеевского, Вейделевского, Красноярского, Грайворонского районов и пгт. Борисовка [32, 33]. До 1930-х гг. ассимиляция двух этнических групп происходила достаточно медленно в двух направлениях: в населенных пунктах с

преобладанием русских ассимилировались украинцы (в основном женщины); в населенных пунктах с преобладанием украинского населения — русские. Значительные изменения в национальном составе белгородского региона произошли в 1920–30-е гг. в результате экономических (голодомор) и социально-политических преобразований. Резко сократилась численность украинского населения, и область фактически стала однонациональной. Так, за 1939–1959 гг. численность украинцев сократилась в 2,5 раза [32]. Как отмечает В.В. Бубликов [32], в послевоенный период «автохтонное украинское население Белгородчины» переселялось в крупные города, активно ассимилируясь (к 1960–1970 гг.), и наблюдался рост новых этно-территориальных групп населения. В 1940–1950 гг. увеличилась доля белорусов, армян, грузин, молдаван, чувашей и др., обусловленная перераспределением трудовых и кадровых ресурсов на территории бывшего СССР. По мнению В.В. Бубликова, В.В. Марковой [30], «отсутствие вплоть до 1970-х гг. на территории Белгородской области сколь-нибудь значимых «Всесоюзныхстроек» привело к относительно медленным темпам роста этнической дифференциации региона».

Административно-территориальные преобразования XX в., рост численности населения области, изменение эффективного размера популяции и активные миграционные процессы, о причинах и особенностях которых в разные временные периоды упоминалось в предыдущих работах [21–24], способствовали незначительному уменьшению доли русского населения (у мужчин с 99.02 до 90.93%, у женщин с 99.42 до 91.88%), увеличению доли украинцев (у мужчин с 0.99 до 5.05%, у женщин с 0.57 до 5.38%) и лиц других национальностей (у мужчин с 0 до 4.03, у женщин с 0.20 до 2.74%). При этом в регионе на протяжении всего 130-летнего периода значимых отличий в динамике мужчин и женщин русской национальности между



городом и селом не установлено. Тогда как доля женщин украинской национальности с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг. увеличилась в среднем в 7.5 раза в городе и в 6 раз в селе, а доля мужчин украинской национальности значительно увеличилась в селе (в среднем в 4 раза), чем в городе (в среднем в 2 раза). За анализируемый период наблюдался рост доли других национальностей (кроме русской и украинской) среди женщин как в городе (в 5 раз), так и в селе (в 6 раз), а среди мужчин более интенсивный рост наблюдался в городе (в 5 раз), чем в селе (в 2 раза).

Следует отметить, что наблюдалась положительная брачная ассортативность по национальному признаку без отличий между городом и селом во все исследуемые периоды по русской национальности. Брачная избирательность по украинской национальности снизилась в целом за 130 лет (и в городе, и в селе), а по другим национальностям уменьшалась в целом в городах, но увеличилась в селах.

Ранее Л.А. Атраментовой и О.В. Филипповой при изучении национального состава в белгородской популяции за 1960, 1985 и 1995 гг. было установлено, что русские являлись коренной этнической группой, превышающей чуть более 90% населения [19], что согласуется с результатами наших исследований. Во все анализируемые годы русских женщин было больше, чем русских мужчин, вступивших в брак. Следующей по численности этнической группой были украинцы, доля которых уменьшилась с 7,3 до 4,8% в период с 1960 по 1995 г. Процент лиц из других этнических групп увеличился почти в 2 раза (с 0,73 до 1,21%). Авторами отмечалось, что положительные индексы ассортативности брака были самыми высокими для групп этнических меньшинств и самый низкий у украинцев [19].

Моноэтничность национального состава была установлена ранее и для соседней Курской области: в 1987–1990 гг. основной национальностью супругов являлась русская национальность (95.86% среди женихов и 94.20 % среди невест) [9]. На долю украинской национальности приходилось в среднем среди мужчин 2.14% и 4.14% среди женщин. На долю других национальностей приходилось 1.99% среди мужчин и 1.61% среди женщин. В брачной структуре преобладали русские однонациональные браки (в среднем 90.04%). В отличие от Белгородского региона население Курского региона отличалось низкой брачной избирательностью по национальности (0.244). За 30-летний период (с 1960–1963 гг. до 1987–1990 гг.) наблюдалось уменьшение доли однонациональных браков в большинстве районных популяций Курской области, увеличение брачной ассортативности по национальности во всех анализируемых районах [9].

Снижение значения индекса этнической брачной ассортативности (с 96.92 до 80.98% соответственно) за два поколения (с 1940–1945 гг. к 2000–2005 гг.) отмечалось в Кемеровской области [14]. Положительная брачная ассортативность по национальности установлена среди сельского населения (особенно у коренных народов) республик Саха (Якутия), Чувашия, Карачаево-Черкесия, Марий Эл, Башкирия, Северная Осетия и др. [11–13, 17, 34–42]. В данных популяциях имел место «эффект национального меньшинства» [11, 13, 35–38]. Отмечалось, что при проживании на одной территории различных народов этническая ассортативность наиболее высока у представителей малочисленных этносов для данной популяции. Так, североосетинские кумыки компактно проживают на территории республики, занимая определенные районы, и этническая брачная ассортативность у них равна 3.3 [44]. В районах с полиэтничным населением республик Северная Осетия – Алания и Карачаево-Черкесия высокая степень межэтнических браков регистрируется у пришлого населения (у армян, азербайджанцев, украинцев), причем как у мужчин, так и у женщин (более половины) [12].

Проведенный корреляционный анализ между ранее изучаемыми популяционно-демографическими показателями (структура брачных миграций, параметры изоляции расстоянием Малек, возраст вступления в брак) [21–24] в Белгородской области в разрезе пяти временных периодов показал, что увеличение среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов с учетом дальних миграций приводило к увеличению доли мужчин других (кроме русской и украинской) национальностей ( $r = 0.90$ ,  $p = 0.037$ ) и доли женщин украинской национальности ( $r = 0.90$ ,  $p = 0.037$ ), а увеличение среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов без учета дальних миграций приводило к снижению доли мужчин ( $r = -0.90$ ,  $p = 0.037$ ) и женщин русской национальности ( $r = -0.90$ ,  $p = 0.037$ ) и росту доли женщин других национальностей ( $r = 0.90$ ,  $p = 0.037$ ). Также увеличение расстояний между местами рождения супругов как с учетом дальних миграций, так и без них приводило к росту доли гетеролокальных браков и снижению удельного веса изолакальных браков. Следует отметить, что активные миграционные процессы последних десятилетий, рост числа смешанных браков могут приводить к увеличению генетического разнообразия популяций.

Исследование национального состава, помимо раскрытия истории миграционных потоков населения, может иметь практическое значение для прогнозирования возможных генетически обусловленных заболеваний. Многочисленными исследованиями показано, что частота и распространенность наследственно-детерминированных заболеваний человека различны в определенных этнических

группах [10, 12, 17, 37, 40, 45]. Брачная ассортативность в отношении этнической принадлежности, мест рождения супругов может оказывать существенное влияние на формирование генетической структуры [13, 15, 16, 42, 43]. Изучение национального состава населения наряду с другими брачно-миграционными показателями необходимо проводить при планировании популяционно-генетических и медико-генетических исследований [45–58].

Работа выполнена без финансирования, на личные средства.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курбатова О. Л., Удина И. Г., Грачева А. С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Санкт-Петербурга. Миграционные процессы // Генетика. 2019. Т. 55. № 9. С. 1071–1082. DOI: 10.1134/S001667581909008X
2. Курбатова О. Л., Победоносцева Е. Ю., Имашева А. Г. Роль миграционных процессов в формировании брачной структуры московской популяции. Сообщ. 1. Возраст, место рождения и национальность вступающих в брак // Генетика. 1984. Т. 20. № 3. С. 501–511.
3. Курбатова О. Л., Победоносцева Е. Ю. Роль миграционных процессов в формировании брачной структуры московской популяции. Сообщ. 2. Брачная ассортативность в отношении возраста, места рождения и национальности супругов // Генетика. 1988. Т. 24. № 9. С. 1679–1688.
4. Курбатова О. Л., Удина И. Г., Грачева А. С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Новосибирска // Генетика. 2018. Т. 54. № 13. Прил. С. 74–83. DOI: 10.1134/S0016675818130106
5. Грачева А. С., Победоносцева Е. Ю., Удина И. Г., Курбатова О. Л. Территориальная подразделенность популяции мегаполиса по этническому признаку в связи с проблемой создания генетических баз данных. Москва // Генетика. 2020. Т. 56. № 12. С. 1452–1461. DOI: 10.31857/S0016675820120073
6. Грачева А. С., Победоносцева Е. Ю., Удина И. Г., Курбатова О. Л. Этническая топография мегаполисов: Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск // Национальные демографические приоритеты: новые подходы, тенденции: сб. Сер.: Демография. Социология. Экономика. / под ред. С. В. Рязанцева, Т. К. Ростовской. М., 2019. С. 401–404.
7. Сладкова С. В., Ревазов А. А., Голубцов В. И., Кадошников М. Ю. Анализ структуры городских и сельских популяций центральной части Краснодарского края // Генетика. 1990. Т. 26. № 11. С. 2070–2075.
8. Тураева Ш. М., Некрасова Е. П., Ревазов А. В., Кадышева Е. К. Популяционно-генетическая структура населения г. Ашхабада Туркменской ССР // Генетика. 1991. Т. 27. № 8. С. 1451–1459.
9. Чурносоев М. И. Генетико-демографическая структура и распространенность мультифакториальных признаков в популяции Курской области: автореф. дис ... д-ра мед. наук. М., 1997. С. 40.
10. Цыбовский И. С., Спивак Е. А., Котова С. А. и др. Территориальная подразделенность популяции мегаполиса по этническому признаку в связи с проблемой создания генетических баз данных. Минск // Генетика. 2021. Т. 57. № 8. С. 955–963. DOI: 10.31857/S0016675821080142
11. Ельчинова Г. И., Кадышев В. В., Зинченко Р. А. Истоки формирования русского городского населения Северного Кавказа // Генетика. 2021. Т. 57. № 8. С. 970–973. DOI: 10.31857/S001667582108004X
12. Ельчинова Г. И., Зинченко Р. А. Гендерная дифференциация межэтнических браков населения Северного Кавказа // Мед. генетика. 2023. Т. 22. № 2. С. 48–51. DOI: 10.25557/2073-7998.2023.02.48-51
13. Ельчинова Г. И., Кадышев В. В., Гетоева З. К. и др. Брачная этническая ассортативность и метисация населения Северной Осетии (конец XX века) // Вестник МГУ. Сер. 23: Антропология. 2019. № 3. С. 77–81. DOI: 10.32521/2074-8132.2019.3.077-081
14. Лавряшина М. Б., Ульянова М. В. Генетико-демографические процессы в населении Кузбасса: динамика этнической и возрастной брачной ассортативности в населении г. Белово // Генетика. 2005. Т. 41. № 7. С. 938–942.
15. Ульянова М. В., Кучер А. Н., Лавряшина М. Б. Генетико-демографическое изучение шорцев Таштагольского района Кемеровской области: динамика брачно-миграционной структуры // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 133–139.
16. Лавряшина М. Б., Ульянова М. В., Балановская Е. В. Коренные народы Южной Сибири: Воспроизводство и динамика популяционных генофондов. Новосибирск: Наука, 2016. 311 с.
17. Конева Л. А. Моделирование распространенности спиноцереbellарной атаксии I типа в зависимости от особенностей генетико-демографических процессов в якутских популяциях: автореф. дис. Томск, 2009.
18. Атраментова Л. А., Мещерякова И. П. Генетико-демографические параметры брачной структуры евпаторийской популяции //

- Генетика. 2007. Т. 43. № 3. С. 400–408.  
DOI: 10.1134/S1022795407030143
19. *Атраментова Л. А., Филиппова О. В.* Генетико-демографическая структура белгородской популяции: возраст, национальность, образование, профессия // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 823–829. С. 553–562.
  20. *Бубликов В. В., Маркова В. В.* Формирование этнического состава населения Белгородской области. Ч. 1. XIX век – середина XX столетия // Научные ведомости. Сер.: Философия. Социология. Право. 2013. № 23. Вып. 26. С. 49–59.
  21. *Сергеева К. Н., Соколов С. Н., Батлуцкая И. В., Соколова И. Н.* Динамика популяционной структуры населения юга Центральной России за 130-летний период. Миграционные процессы // Генетика. 2024. Т. 60. № 8. С. 110–117.
  22. *Сергеева К. Н., Соколов С. Н., Гончарова Ю. И. и др.* Изменение популяционной структуры населения Курской и Воронежской губерний в первой половине XX в. Изоляция расстоянием Малек // Генетика. 2024. Т. 60. № 9. С. 90–97.
  23. *Сергеева К. Н., Соколов С. Н., Гончарова Ю. И. и др.* Динамика популяционной структуры населения Белгородской области. Изоляция расстоянием Малек // Генетика. 2024. Т. 60. № 9. С. 98–109.
  24. *Сергеева К. Н., Гончарова Ю. И., Невинных А. С. и др.* Динамика популяционной структуры населения юга Центральной России за 130-летний период. Возраст вступления в брак // Генетика. 2024. Т. 60. № 10. С. 90–102.
  25. *Сергеева К. Н., Соколов С. Н., Ефремова О. А. и др.* Анализ уровня эндогамии популяции как основа популяционно-генетических и медико-генетических исследований // Науч. рез-ты биомед. исслед. 2021. Т. 7. № 4. С. 375–387.  
DOI: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-4
  26. *Бочков Н. П., Николаева И. В., Тихопой М. В. и др.* Брачная ассортативность в населении современного города // Генетика. 1984. Т. 20. № 7. С. 1224–1229.
  27. *Курбатова О. Л., Победоносцева Е. Ю.* Городские популяции: возможности генетической демографии (миграция, подразделенность, аутбридинг) // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 155–188.
  28. *Алтухов Ю. П.* Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука, 2004. 619 с.
  29. *Филонович С. А.* История заселения Центрального Черноземья в зоне русско-украинских контактов // Вестник Армавирского гос. пед. ун-та. 2010. № 1. С. 135–144.
  30. *Бубликов В. В., Маркова В. В.* Формирование этнического состава населения Белгородской области. Ч. 2. Середина XX столетия – начало XXI века // Науч. ведомости. Сер.: Философия. Социология. Право. 2014. № 9. Вып. 28. С. 44–55.
  31. *Дудка А. И., Оноприенко И. Г.* Этнокультурный синтез в великорусских губерниях юга России в пореформенный период (на примере Курской и Воронежской губерний) // Науч. ведомости. Сер.: История. Политология. Экономика. Информатика. 2011. № 20. Вып. 40. С. 138–144.
  32. *Бубликов В. В.* Причины и последствия «этнической революции» 1930-х гг. на Белгородчине. Ч. 1 // Науч. ведомости. Сер.: Философия. Социология. Право. 2016. № 24(245). Вып. 38. С. 38–46.
  33. *Бубликов В. В.* Причины и последствия «этнической революции» 1930-х гг. на Белгородчине. Ч. 2 // Науч. ведомости. Сер.: Философия. Социология. Право. 2017. № 10(259). Вып. 40. С. 31–40.
  34. *Ельчинова Г. И., Зинченко Р. А., Гинтер Е. К.* Временная динамика этнической ассортативности в Цивильском районе Чувашии // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 562.
  35. *Тарская Л. А., Ельчинова Г. И., Винокуров В. Н.* Анализ брачных миграций в двух районах Республики Саха (Якутия) // Генетика. 2003. Т. 39. № 12. С. 1698–1701.
  36. *Тарская Л. А., Зинченко Р. А., Ельчинова Г. И. и др.* Структура и разнообразие наследственной патологии в республике Саха (Якутия) // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1530–1539.
  37. *Ельчинова Г. И., Старцева Е. А., Мамедова Р. А. и др.* Популяционная структура Горно-Марийского района республики Марий Эл // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1425–1432.
  38. *Ельчинова Г. И., Макаев А. Х.-М., Петрин А. Н., Зинченко Р. А.* Брачная этническая ассортативность городского и сельского населения Карачаево-Черкесии // Генетика. 2017. Т. 53. № 7. С. 877–880. DOI: 10.7868/S0016675817060054
  39. *Ельчинова Г. И., Макаев А. Х.-М., Ревазова Ю. А. и др.* Брачно-миграционная характеристика черкесов (конец XX века) // Генетика. 2016. Т. 52. № 3. С. 385–388. DOI: 10.7868/S0016675816030061
  40. *Ельчинова Г. И., Хидиятова И. М., Морозова А. А. и др.* Медико-генетическое изучение населения Республики Башкортостан. Сообщ. III. Временная динамика этнической ассортативности зауральских башкир // Мед. генетика. 2007. Т. 6. № 7(61). С. 43–46.
  41. *Кучер А. Н., Данилова А. Л., Конева Л. А., Ноговицина А. Н.* Структура браков в якутских популяциях: национальный состав и инбридинг по изонимии // Генетика. 2010. Т. 46. № 3. С. 408–416.
  42. *Кучер А. Н., Данилова А. Л., Конева Л. А., Ноговицина А. Н.* Популяционная структура сельских населенных пунктов Республики Саха (Якутия): национальный и половозрастной состав,



- витальные статистики // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1718–1726.
43. *Ельчинова Г. И., Гетоева З. К., Кадышев В. В. и др.* Популяционно-генетические параметры североосетинских кумыков // Мед. генетика. 2022. Т. 21. № 5. С. 42–45.
  44. *Гинтер Е. К.* Наследственные болезни в популяциях человека. М.: Медицина, 2002. 304 с.
  45. *Сорокина И. Н., Рудых Н. А., Безменова И. Н. и др.* Популяционно-генетические характеристики и генетико-эпидемиологическое исследование ассоциаций генов-кандидатов с мультифакториальными заболеваниями // Науч. рез-ты биомед. исслед. 2018. Т. 4. № 4. С. 20–30. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-3
  46. *Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al.* Matrix metalloproteinase gene polymorphisms are associated with breast cancer in the Caucasian women of Russia // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 20. P. 12638. DOI: 10.3390/ijms232012638
  47. *Азарова Ю. Э., Гуреева А. В., Постникова М. И. и др.* Связь однонуклеотидного полиморфизма rs4880 гена *SOD2* с развитием микрососудистых осложнений сахарного диабета 2-го типа // Науч. рез-ты биомед. исслед. 2023. Т. 9. № 4. С. 461–473. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-3
  48. *Churnosov M., Abramova M., Reshetnikov E. et al.* Polymorphisms of hypertension susceptibility genes as a risk factors of preeclampsia in the Caucasian population of central Russia // Placenta. 2022. V. 129. P. 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.09.010>.
  49. *Sirotnina S., Ponomarenko I., Kharchenko A. et al.* A Novel polymorphism in the promoter of the CYP4A11 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease // Dis. Markers. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5812802>
  50. *Аюпова Г. Р., Хусаинова Р. И.* Клинико-генетическая характеристика муковисцидоза в Республике Башкортостан // Науч. рез-ты биомед. исслед. 2023. Т. 9. № 4. С. 474–485. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-4
  51. *Pavlova N., Demin S., Churnosov M. et al.* The modifying effect of obesity on the association of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer risk // Biomedicines. 2022. V. 10. № 10. DOI:10.3390/biomedicines10102617
  52. *Ivanova T., Churnosova M., Abramova M. et al.* Sex-Specific Features of the correlation between GWAS-noticeable polymorphisms and hypertension in Europeans of Russia // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. [doi.org/10.3390/ijms24097799](https://doi.org/10.3390/ijms24097799).
  53. *Понасенко А. В., Сеницкая А. В., Хуторная М. В. и др.* Полиморфные локусы генов матриксных металлопротеиназ ассоциированы с развитием ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом // Науч. рез-ты биомед. исслед. 2024. Т. 10. № 2. С. 206–221. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-3
  54. *Polonikov A., Kharchenko A., Bykanova M. et al.* Polymorphisms of *CYP2C8*, *CYP2C9* and *CYP2C19* and risk of coronary heart disease in Russian population // Gene. 2017. V. 627. P. 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004>
  55. *Novakov V., Novakova O., Churnosova M. et al.* Intergenic interactions of *SBNO1*, *NFAT5* and *GLT8D1* determine the susceptibility to knee osteoarthritis among Europeans of Russia // Life. 2023. V. 13. P. 405. [doi.org/10.3390/life13020405](https://doi.org/10.3390/life13020405).
  56. *Eliseeva N., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* *LOXLI* gene polymorphism candidates for exfoliation glaucoma are also associated with a risk for primary open-angle glaucoma in a Caucasian population from central Russia // Mol. Vis. 2021. V. 27. P. 262–269.
  57. *Abramova M., Churnosova M., Efremova O. et al.* Effects of pre-pregnancy overweight/obesity on the pattern of association of hypertension susceptibility genes with preeclampsia // Life (Basel). 2022. V. 12. №12. DOI:10.3390/life12122018
  58. *Ivanova T., Churnosova M., Abramova M. et al.* Risk effects of rs1799945 polymorphism of the HFE gene and intergenic interactions of GWAS-significant loci for arterial hypertension in the caucasian population of Central Russia // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 9. [doi.org/10.3390/ijms24098309](https://doi.org/10.3390/ijms24098309)



## Population Structure Dynamics of Belgorod Oblast: Ethnic Composition

K. N. Sergeeva<sup>1</sup>, S. N. Sokorev<sup>1</sup>, Y. I. Goncharova<sup>1</sup>, I. V. Batlutskaya<sup>1</sup>, I. N. Sorokina<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Belgorod National Research University Belgorod, 308015 Russia*

*\*e-mail: Sorokina\_5@mail.ru*

The results of an analysis of the dynamics of the nationality of spouses in the Belgorod region from 1890–1910 are presented. for 2016–2018 A fairly homogeneous national composition has been established with a predominance of Russian nationality (more than 90% among both men and women) in all time periods. Over the 130–year period, the share of Russian nationality decreased slightly (1.1 times among both men and women) and the shares of Ukrainians increased (from 0.99% to 5.05% for men and from 0.57% to 5.38% for women) and other nationalities (from 0% to 4.03% in men and from 0.20% to 2.74% in women). The ethnic marital assortative index shows constancy for Russian nationality, a stable decline for Ukrainian nationality (both in the city and in the countryside), and for other nationalities a decrease for the urban population and an increase for the rural population.

**Keywords:** national structure, ethnic marriage assortativity.

УДК: 575.162

## ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *LEP* В РАЗЛИЧНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

© 2024 г. Е. В. Беляева<sup>1, \*</sup>, Т. А. Баирова<sup>1</sup>, О. А. Ершова<sup>1</sup>, А. Ю. Самбялова<sup>1</sup>, В. В. Синьков<sup>1</sup>, В. В. Бальжиева<sup>1</sup>, Л. В. Рычкова<sup>1</sup>, Л. И. Колесникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

\*e-mail: belyeva\_irk@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 28.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

Ген, кодирующий лептин (*LEP*), иначе называют геном фактора ожирения. Показано, что полиморфные локусы и мутации в гене *LEP* могут вызывать нарушения обмена веществ и приводить к ожирению, а также развитию различных патологий, связанных с ожирением. Цель данного исследования – провести поиск полиморфных вариантов гена *LEP* в группах подростков с избыточной массой тела и/или ожирением в этнических выборках русских и бурят. В исследовании приняли участие 48 подростков от 11 до 17 лет (средний возраст  $14,27 \pm 2,09$  лет) с разным статусом веса: нормальной массой тела и избыточной массой тела и/или ожирением. Из них русских – 21, бурят – 27. Методы исследования включали: оценку клинического статуса и антропометрических показателей; полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование по методу Сэнгера фрагмента гена *LEP*; биоинформационный анализ; статистическую обработку полученных результатов. В исследовании были подобраны условия амплификации для фрагмента гена *LEP* общей протяженностью 3878 п. н. (128251456–128255334) и проведено его секвенирование. После биоинформатической обработки полученных результатов в исследованной группе подростков с разным статусом веса обнаружено десять SNP. Из них семь зарегистрированных в базе NCBI и три замены, ранее не зарегистрированных в NCBI. Из семи полиморфизмов, зарегистрированных в NCBI, два SNP идентифицированы во всех группах исследования, два SNP выявлены в основной группе, из них один в группе русских, один в группе бурят, а также три SNP обнаружены только в контрольной группе у подростков бурят. Три SNP, не зарегистрированные в NCBI, были идентифицированы только в группе подростков с избыточной массой тела и/или ожирением, в том числе два в группе русских – chr7:128255051 (G>C), chr7:128255092 (G>C), и один в группе бурят – chr7:128254681 (C>G). В исследовании охарактеризована частота SNP, идентифицированных в результате секвенирования фрагмента гена *LEP* в группах подростков с разным статусом веса.

**Ключевые слова:** ген лептина, секвенирование, избыточная масса тела, ожирение, подростки.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110063 **EDN:** WBGYWX

Урбанизация и изменение образа жизни внесли вклад в стремительный рост числа случаев детского ожирения и избыточной массы тела [1]. Это может быть связано с несколькими факторами, включая неоптимальные методы вскармливания детей первого года жизни, растущую доступность ультраобработанных пищевых продуктов в мировых продовольственных запасах и изменения в рационе детей [2, 3]. Ожирение – сложное многофакторное заболевание, связанное с генетическими факторами и факторами окружающей среды. Кроме этого, реакция организма на диету и физическую активность при лечении ожирения также генетически детерминированы [4]. Развитие

методов полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) и секвенирования следующего поколения (NGS) способствовало открытию генетических полиморфизмов, ассоциированных с ожирением. Формирование моногенного ожирения связывают по меньшей мере с пятью генами: лептина (*LEP*), рецептора лептина (*LEPR*), рецептора меланокортина 4 (*MCR4*), прогормонконвертазы 1 (*PCSK1*) и проопиомеланокортина (*POMC*) [5].

Наиболее изученным из этих генов является ген *LEP*, его часто называют геном фактора ожирения, так как лептин играет важную роль в регуляции энергетического гомеостаза, в росте плода, провоспалительных иммунных реакциях, ангиогенезе

и липолизе, также регулирует потребление пищи, массу тела и репродуктивную функцию [6]. Лептин секретируется белыми адипоцитами в кровоток, связывается с рецептором лептина в головном мозге, который активирует нижестоящие сигнальные пути, подавляя чувство голода и способствуя расходованию энергии. Ген *LEP* локализован на длинном плече хромосомы 7 (7q32.1), состоит из трех экзонов и двух интронов, кодируемый геном *LEP* белок имеет массу 16кДа и состоит из 167 аминокислот [7].

Для гена *LEP* в базе Национального центра биотехнологической информации США NCBI зарегистрировано 700 SNP [8]. В ClinVar – базе данных о клинической значимости генетических маркеров, ассоциация полиморфизмов гена *LEP* с клиническими фенотипами (заболеваниями) показана для 139 полиморфизмов, из которых 29 определены как патогенные, еще 2 – как вероятно патогенные [9]. По данным ClinVar, ассоциация с ожирением из-за врожденного дефицита лептина показана для пяти полиморфизмов, с дисфункцией лептина для одного полиморфизма.

Исследования по поиску ассоциаций полиморфных вариантов генов энергетического обмена с ожирением и метаболическим синдромом, как правило, проводятся у взрослых [10–12]. В исследованиях у подростков было показано, что полиморфизм гена рецептора лептина *LEPR* и гена рецептора меланокортина 4 *MC4R* связаны с риском развития метаболических нарушений у подростков-европеоидов с избыточной массой тела и ожирением, в то время как у подростков азиатского происхождения с этой патологией ассоциирован полиморфизм гена *FTO* [13]. В другой работе было установлено, что локус rs2167270 гена *LEP* ассоциирован с пищевым поведением у подростков, статистически значимые различия были установлены при анализе показателей пищевого поведения по шкале «Когнитивная сдержанность» опросника TFEQ [14]. Эти результаты согласуются с более ранним исследованием, в котором также была показана ассоциация полиморфных вариантов гена *LEP* с пищевым поведением у чилийских детей по шкалам «Эмоциональное питание» и «Неконтролируемое питание» опросника TFEQ [15].

Таким образом, в исследованиях у подростков была показана ассоциация гена *LEP* с пищевым поведением, в то время как вклад этого гена в развитие детского и подросткового ожирения не установлен. Цель настоящего исследования – провести поиск полиморфных вариантов гена *LEP* в группах подростков с избыточной массой тела и/или ожирением в этнических выборках русских и бурят.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», на территории Республики Бурятия и Иркутской области. Набор пациентов в группы исследования проводился в Клинике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск) и Детской республиканской клинической больнице (г. Улан-Удэ). Из группы 354 подростков, набранной в ходе диспансерного осмотра, описанной нами ранее [16], для данного исследования случайным образом были отобраны 48 подростков от 11 до 17 лет (средний возраст  $14,27 \pm 2,09$  лет) с разным статусом веса, из них 21 русский и 27 бурят. Основная группа данного исследования включала 29 подростков с избыточной массой тела и/или ожирением ( $SDS$  ИМТ  $> 1$ ), из них 14 русских и 15 бурят; контрольная группа включала 19 подростков с нормальной массой тела ( $SDS$  ИМТ  $< 1$ ), из них 7 русских и 12 бурят. Сравнимые группы сопоставимы по полу ( $\chi^2 = 1.3067$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p = 0.253$ ) и возрасту ( $W = 335$ ,  $p = 0.2078$ ) и имеют статистически значимые отличия по антропометрическим показателям: весу ( $W = 45.5$ ,  $p < 0.001$ ), индексу массы тела (ИМТ) ( $W = 0$ ,  $p < 0.001$ ),  $SDS$  ИМТ ( $W = 0$ ,  $p < 0.001$ ).

Принадлежность к этнической группе устанавливали на основе опроса обследуемых об этнической принадлежности родственников I–III степени родства. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (протокол заседания № 6 от 02.12.2015 г.) и соответствует этическим принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Бразилия, 2013 г.). В работе с подростками руководствовались ст. 24 «Права несовершеннолетних» «Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22.07.1993 № 5487-1 (с изменениями от 20.12.1999).

Антропометрическое обследование подростков включало измерение роста и веса. Рост и вес оценивались по перцентильным таблицам для данного пола и возраста с последующим расчетом индекса массы тела (ИМТ) как отношения массы тела в килограммах к квадрату роста человека, выраженному в метрах, и коэффициента стандартного отклонения ( $SDS$  ИМТ) с помощью компьютерной программы Aukology 1.0 b17 (Pfizer, США). Масса тела классифицировалась как избыточная в случаях значения  $SDS$  ИМТ от 1 до 2, ожирение диагностировали при  $SDS$  ИМТ  $> 2$ .

Молекулярно-генетическое исследование полиморфных локусов гена *LEP* проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей электрофоретической детекцией и

секвенирования по методу Сэнгера. Экстракцию геномной ДНК проводили из цельной венозной крови, забранной в вакуумную пробирку объемом 4.0 мл с КЗ ЭДТА с использованием коммерческих наборов «ДНК Сорб-Б» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

С использованием программы Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) были подобраны 36 олигонуклеотидов (18 пар), которые полностью перекрывают последовательность гена *LEP*. В настоящем исследовании представлены результаты работы с четырьмя парами праймеров. Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО «Евроген», их характеристика приведена в табл. 1.

Для каждой пары праймеров проводили подбор оптимальных условий амплификации: температуру отжига праймеров, количественное соотношение компонентов реакционной смеси для амплификации, программу амплификации (варьирование температурных полок, времени инкубации и количества циклов). Для подбора температуры отжига праймеров использовали следующую формулу:  $T = 2(AT) + 4(GC)$  (инструкция к набору реагентов ScreenMix), где  $T$  – температура отжига праймеров;  $AT$  – количество нуклеотидов аденин и тимин;  $GC$  – количество нуклеотидов гуанин и цитозин, входящих в праймер. Также для подбора температуры

отжига праймеров использовали онлайн-калькулятор на сайте компании Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com>). Для каждой пары праймеров ставили не менее трех экспериментальных установок ПЦР, варьируя температуру отжига. Амплификацию фрагментов гена *LEP* проводили на амплификаторе нуклеиновых кислот «ДТ-Прайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с использованием готовой смеси для ПЦР Screen Mix (ЗАО «Евроген»). Компоненты ПЦР смешивали в последовательности и объемах, приведенных в табл. 2, амплификацию проводили по программе, приведенной в табл. 3, согласно протоколу производителя набора реагентов.

Детекцию продуктов амплификации осуществляли в 1.5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Продукты ПЦР вырезали из геля и очищали с помощью спин-колонок. Далее проводили секвенирование продуктов ПЦР на автоматическом секвенаторе «НАНОФОР 05» (ООО «Синтол», Россия) с использованием наборов реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), работа с которыми проводилась в соответствии с инструкцией производителя. Результаты секвенирования проходили биоинформационную обработку, которая включала оценку качества хроматограмм и выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей на

**Таблица 1.** Характеристика олигонуклеотидов

Название	Структура	Длина (абсолютное кол-во нуклеотидов)	Молекулярный вес ( $M_w$ ) г/моль
s14_L867	CCAGACACTGGCAGTCTACC	20	6028
s14_R867	AAACTGCACTCCAGGGAGAC	20	6101
s15_L880	GGAAAAGCTGACTGGGAGGG	20	6277
s15_R880	TGGATAAGGGGTGTCCATGC	20	6194
s17_L857	CGATTAGCTGAGCCACATGC	20	6083
s17_R857	GGGCTCCCGTGATATTGTGT	20	6136
s18_L910	TGGGTGAGTAGCATAATCGCT	21	6481
s18_R910	GGAATCTCAGCAGGCAGAGG	20	6197

**Таблица 2.** Последовательность внесения и объемы компонентов ПЦР-смеси

Компонент	Кол-во, мкл на один образец ДНК
Стерильная вода	5.2
Screen Mix	2.0
ПЦР-праймер 1 (L-левый)	0.4
ПЦР-праймер 2 (R-правый)	0.4
ДНК-матрица	2.0
Общий объем ПЦР-смеси	10.0



Таблица 3. Программа амплификации

Стадия		Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
1	Предварительная денатурация	95	5 мин	1
2	Денатурация:	95	30 с	40
	– отжиг праймеров	52–70	30 с	
	– элонгация	72	30 с	
3	Хранение	4		

референсную гена *LEP* NG\_007450.1 RefSeqGene в программе Unipro UGENE.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы RStudio, которая находится в свободном доступе. Для описания количественных признаков использовали следующие показатели описательной статистики: для показателя «возраст» применяли среднее арифметическое (*M*) и стандартное отклонение (*sd*); для антропометрических показателей – медиану с размахом в виде первого и третьего квартилей [*Me* (*Q1*; *Q3*)]. При анализе различий между группами по антропометрическим признакам использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (*U*). Нулевую гипотезу об отсутствии статистически значимых отличий отклоняли при уровне значимости 5%.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведение исследования было разделено на два этапа. На первом проводился подбор условий амплификации фрагмента гена *LEP*. На втором этапе с образцами ДНК основной и контрольной групп последовательно проводили ПЦР, секвенирование по Сэнгеру и идентификацию SNP. Подбор оптимальных условий амплификации проводили последовательно для каждой пары праймеров с использованием пяти случайно выбранных образцов ДНК.

Подбор условий ПЦР для 14-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s14\_L867 s14\_R867) был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров (инструкция к набору реагентов ScreenMix) температура для левого праймера (s14\_L867) составила 64°C, для правого (s14\_R867) – 62°C. Температура отжига для этой пары праймеров, вычисленная с помощью онлайн-калькулятора на сайте компании Thermo Fisher, составила 64.9°C. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации провели три постановки ПЦР с температурой отжига праймеров: 58, 60 и 62°C. Ожидаемый результат эксперимента – получить ампликоны размером 867 пн с минимальным количеством побочных и неспецифичных продуктов

амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров и снижению концентрации праймеров в амплификационной смеси оптимальные условия были подобраны: температура отжига 60°C, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 20% от исходного (0,32 мкл).

Подбор условий ПЦР для 15-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s15\_L880, s15\_R880), как и для 14-й пары праймеров, был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров температура для левого праймера (s15\_L880) составила 64°C, для правого (s15\_R880) – 62°C. Температура отжига для этой пары праймеров, вычисленная с помощью онлайн-калькулятора на сайте компании Thermo Fisher составила 64.9°C. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации осуществили три постановки ПЦР-реакции с температурой отжига праймеров: 58, 60 и 62°C. Ожидаемый результат эксперимента – получить ампликоны размером 880 пн с минимальным количеством димеров праймеров и продуктов неспецифичной амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров, снижению концентрации праймеров и ДНК-матрицы в амплификационной смеси, изменения времени элонгации в программе амплификации оптимальные условия были подобраны: температура отжига 63°C, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 20% (0,32 мкл), увеличение количества ДНК в ПЦР смеси на 50% (3 мкл), увеличение времени элонгации в ПЦР программе в 3 раза (90 с).

Подбор условий ПЦР для 17-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s17\_L857, s17\_R857) традиционно был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров температура для левого праймера (s17\_L857) составила 62°C, для правого (s17\_R857) также 62°C. Температура отжига для этой пары праймеров, вычисленная с помощью онлайн-калькулятора на сайте компании Thermo Fisher, составила 64.3°C. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации поставили три ПЦР с температурой отжига праймеров: 56, 58 и

60°С. Ожидаемый результат эксперимента – получить ампликоны размером 857 пн с минимальным количеством димеров праймеров и продуктов неспецифичной амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров, снижению концентрации праймеров в амплификационной смеси, изменению времени элонгации в программе амплификации оптимальные условия были подобраны: температура отжига 64°С, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 10% от исходного (0,36 мкл), время элонгации 1 с, стандартное количество циклов 45, время первичной денатурации ДНК 3 мин.

Подбор условий ПЦР для 18-й пары праймеров (олигонуклеотиды: s18\_L910, s18\_R910), как и для других праймеров, был начат с температуры отжига. Согласно формуле для подбора температуры отжига праймеров температура для левого праймера (s18\_L910) составила 62°С, для правого (s18\_R910) – 64°С. Онлайн-калькулятор на сайте Thermo Fisher вычислил температуру отжига для этой пары праймеров – 64,2°С. Для первого этапа эксперимента по подбору оптимальных условий амплификации поставили три ПЦР с температурой отжига праймеров: 57, 59 и 61°С. Ожидаемый результат эксперимента – получить ампликоны размером 910 п. н. с минимальным количеством димеров праймеров и продуктов неспецифичной амплификации. После серии экспериментов по варьированию температуры отжига праймеров, снижению концентрации праймеров в амплификационной смеси, изменению времени элонгации и количества циклов в программе амплификации оптимальные условия были подобраны: температура отжига 64°С, уменьшение количества праймеров в ПЦР смеси на 10% от исходного (0,36 мкл), время

элонгации 1 с, количество циклов ПЦР – 40, время первичной денатурации ДНК 3 мин.

Краткое описание подобранных условий ПЦР для пяти праймеров гена *LEP* представлено в табл. 4.

На втором этапе исследования, после того как оптимальные условия для амплификации были подобраны, проведено секвенирование фрагмента гена *LEP*. После выравнивания полученных результатов на референсную последовательность и биоинформационной обработки полученных данных нами идентифицировано 10 однонуклеотидных замен, из них семь зарегистрированы в базе NCBI и три замены не зарегистрированы в NCBI. Характеристика выявленных SNP приведена в табл. 5 и 6.

Из семи полиморфизмов, зарегистрированных в NCBI, два SNP rs7788818, получится (rs3828942; rs7788818) идентифицированы во всех группах исследования, два 3 SNP выявлено только в основной группе, из них один – в группе русских (rs28954118), один – в группе бурят (rs759854910), а также три SNP обнаружены только в контрольной группе у подростков бурят (rs144755411, rs199893150, rs917105894). Так, альтернативный *A*-аллель полиморфизма rs3828942 был выявлен во всех группах исследования, его частота оказалась выше частоты референсного аллеля. В основной группе частота *A*-аллеля rs3828942 составила 50 и 77% у русских и бурят соответственно, в группе контроля – 70 и 89% у русских и бурят соответственно. *G*-аллель rs7788818 также был идентифицирован во всех группах исследования, его частота оказалась выше частоты референсного аллеля. *T*-аллель rs28954118 идентифицирован только у русских подростков

**Таблица 4.** Оптимальные условия ПЦР пяти фрагментов гена *LEP*

Варьируемые условия	Название и длина фрагмента				
	S14, 867 пн	S15, 880 пн	S16, 891 пн*	S17, 857 пн	S18, 910 пн
Количество праймеров	–20% 0.32 мкл	Стандартно 0.4 мкл	–10% 0.36 мкл	Стандартно 0.4 мкл	–10% 0.36 мкл
Количество ДНК-матрицы	Стандартно 2 мкл	Увеличено 3 мкл	Стандартно 2 мкл	Стандартно 2 мкл	Стандартно 2 мкл
Температура отжига праймеров, °С	60	63	60	64	64
Время элонгации в программе амплификации, с	Стандартно 30	Увеличено 90	Стандартно 30	Снижено 1	Снижено 1
Количество циклов ПЦР-программы	Стандартно 40	Стандартно 40	Стандартно 40	Увеличено 45	Стандартно 40

Примечание. \* – подбор условий для фрагмента S16 размером 891 п. н. описан нами ранее [17].

**Таблица 5.** Характеристика идентифицированных SNP, зарегистрированных в NCBI, и частота альтернативного аллеля в группах исследования

№	Идентификатор db SNP	Изменения нуклеотидов	Частота альтернативного аллеля				
			символ аллеля	основная группа		контрольная группа	
				русские <i>n</i> = 14	буряты <i>n</i> = 15	русские <i>n</i> = 7	буряты <i>n</i> = 12
1	rs3828942*	g.17975G>A	A	0.5	0.77	0.7	0.89
2	rs28954118*	g.18852A>T	T	0.107	–	–	–
3	rs759854910*	g.18478G>C	C	–	0.033	–	–
4	rs7788818	g.17554A>G	G	0.961	0.964	1	1
5	rs144755411	g.17737C>T	T	–	–	–	0.182
6	rs199893150	g.18683C>T	T	–	–	–	0.05
7	rs917105894	g.17282G>T	T	–	–	–	0.056

Примечание. \* – зарегистрировано в Clin.Var.

**Таблица 6.** Характеристика SNP, идентифицированных в группах исследования и не зарегистрированных в базе NCBI

№	Идентификатор	Позиция в гене	Изменения нуклеотидов
1	#18774	chr7:128255051	G > C
2	#18815	chr7:128255092	G > C
3	#18404	chr7:128254681	C > G

основной группы, его частота составила 10%, в то время как C-аллель rs759854910 с частотой 3% обнаружен у подростков бурят основной группы. В контрольной группе идентифицировано три SNP, которые выявлены у подростков бурят. Частота T-аллеля rs144755411 составила 18%, частоты альтернативных аллелей rs199893150 и rs917105894 совпадают и соответствуют 5%.

Три SNP, идентифицированные нами в гене *LEP* и не зарегистрированные в базе NCBI, обнаружены только в группе подростков с избыточной массой тела и ожирением. Каждая из замен была выявлена по одному разу, в том числе две замены в группе русских и одна в группе бурят.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В современном динамично развивающемся мире усиливается влияние процессов глобализации, миграции и урбанизации населения, которые влияют на изменение традиционного рациона [18]. Эти изменения сопровождаются метаболическими нарушениями, которые в свою очередь могут приводить к ожирению. Полиморфизм генов, вовлеченных в механизм контроля массы тела и аппетита, может повышать риск нарушений регуляции

пищевого поведения, в том числе у детей, и приводить к развитию экзогенно-конституционального ожирения [19]. В связи с этим поиск полиморфных локусов генов, ассоциированных с данным патологическим состоянием, является перспективным направлением научных исследований, так как может быть использован для оптимизации подходов к ранней профилактике заболеваний и при формировании групп риска.

В рамках решения цели настоящего исследования были подобраны условия для проведения амплификации фрагмента гена *LEP* протяженностью 3878 п. н. и проведено секвенирование этого участка гена. В изученном фрагменте гена *LEP* нами было выявлено 10 SNP, из них три не зарегистрированы и семь зарегистрированы в базе NCBI, из которых для трех полиморфизмов в базе данных ClinVar показана связь с клиническими фенотипами. Наиболее изученным из этих трех полиморфизмов является rs3828942, для которого в поисковой системе PubMed на апрель 2024 г. имеется 15 публикаций [20], в пяти из которых показана связь этого полиморфизма с заболеваниями [21]. В исследованиях показана ассоциация полиморфизма rs3828942 с более высоким ИМТ у подростков с ожирением [22], формированием метаболического

синдрома у пациентов с шизофренией, принимающих нейролептики [23, 24], возникновением тревожных расстройств у женщин [25] и плохим качеством сна у больных СПИД/ВИЧ [26].

Частота альтернативного *A*-аллеля rs3828942 в среднем в мировой популяции ( $n = 40646$ ), по данным NSBI, составляет 0.41, в европейской популяции ( $n = 33072$ ) – 0.44, в азиатской ( $n = 128$ ) – 0.76. Данные о более высокой частоте *A*-аллеля rs3828942 у жителей Азии (по сравнению с европейцами) согласуются с результатами нашего исследования. Так, в группах русских подростков основной и контрольной групп его частота составила 50 и 70% соответственно, в то время как у подростков бурят основной и контрольной групп – 77 и 89% соответственно.

Два других полиморфизма (rs28954118 и rs759854910) изучены меньше, по ним отсутствуют публикации в PubMed, клиническая значимость в ClinVar оценена как неопределенная. По данным NCBI, частота альтернативного *T*-аллеля rs28954118 в среднем в мировой популяции ( $n = 21484$ ) составляет 0.023, в европейской популяции ( $n = 16894$ ) – 0.028, у азиат ( $n = 114$ ) *T*-аллель не обнаружен. Эти данные также согласуются с результатами нашего исследования, *T*-аллель rs28954118 с частотой 10% обнаружен в группе русских подростков основной группы, среди подростков бурят *T*-аллель не идентифицирован. Частота альтернативного *C*-аллеля rs759854910 в среднем в мировой популяции ( $n = 18532$ ) очень низкая и составляет 0.00005, в европейской популяции ( $n = 13348$ ) – 0.00007, в азиатской популяции ( $n = 112$ ) *C*-аллель не обнаружен. В нашем исследовании *C*-аллель rs759854910 был обнаружен только у подростков бурят основной группы с частотой 3% и не был идентифицирован у русских подростков.

Таким образом, секвенирование фрагмента гена *LEP* в выборке подростков с избыточной массой тела и ожирением позволило идентифицировать 10 SNP, семь из которых зарегистрированы в NSBI, а три не зарегистрированы. В настоящем исследовании впервые в мире идентифицированы полиморфные варианты гена лептина у подростков с избыточной массой тела и ожирением: у русских – chr7:128255051 (*G>C*), chr7:128255092 (*G>C*), у бурят – chr7:128254681 (*C>G*). Из семи SNP, идентифицированных в группах исследования и зарегистрированных в NSBI, только для одного (rs3828942) в PubMed имеются публикации, демонстрирующие связь этого полиморфизма с клиническими фенотипами. Данные о клинической значимости других SNP, идентифицированных нами, недостаточны. Поэтому поиск ассоциаций выявленных нами SNP с ожирением у подростков двух этнических групп является актуальным и станет темой наших дальнейших исследований.

Данная работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск.

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы «Ключевые закономерности и механизмы формирования нарушений здоровья детей и подростков как основа персонализированного подхода к диагностике, лечению и профилактике в современной педиатрии» (шифр темы 0416-2021-001, регистрационный номер в ЕГИСУ №121022500178-3).

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» 02.12.2015 г., протокол заседания № 6.

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

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие: в случае, если возраст обследуемого меньше 14 лет, информированное добровольное согласие получено от родителей, если возраст обследуемого 14 лет и больше – от самого обследуемого.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agrahari M. K., Mallik M., Sapkota K. et al.* Abnormal high body mass index among adolescents of secondary schools // *JNMA: J. Nepal Med. Ass.* 2024. V. 62. № 269. P. 34–36. DOI:10.31729/jnma.8405
2. *Белькова Н. Л., Немченко У. М., Погодина А. В. и др.* Особенности состава и структуры кишечного микробиома подростков с ожирением и разной продолжительностью грудного вскармливания // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2019. Т. 167. № 6. С. 717–721. DOI:10.1007/s10517-019-04617-7
3. *Neri D., Martinez Steele E., Rauber F. et al.* Infants' dietary pattern characterized by ultraprocessed foods is associated with rapid weight gain and overweight/obesity risk: national health and nutrition examination survey 2009–2018 // *J. Acad. of Nutrition and Dietetics.* 2024. V. 24. P. 2212–2672. DOI:10.1016/j.jand.2024.02.003
4. *Егорова Э. С., Ахметов И. И.* Генетические полиморфизмы, ассоциированные с эффективностью коррекции массы тела: систематический обзор // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 8. С. 870–887. DOI:10.31857/S0016675823080052



5. Nordang G. B. N., Busk O. L., Tveten K. Next-generation sequencing of the monogenic obesity genes *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *PCSK1* and *POMC* in a Norwegian cohort of patients with morbid obesity and normal weight controls // *Mol. Genet. and Metabolism*. 2017. V. 121. № 1. P. 51–56. DOI:10.1016/j.ymgme.2017.03.007
6. Obradovic M., Sudar-Milovanovic E., Soskic S. et al. Leptin and obesity: Role and clinical implication. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. V. 12. P. 585887. DOI:10.3389/fendo.2021.585887
7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952> (дата обращения 10.04.2024).
8. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene\\_snp&from\\_uid=3952](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene_snp&from_uid=3952) (дата обращения 10.04.2024).
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> (дата обращения 10.04.2024).
10. Кочетова О. В., Викторова Т. В., Мустафина О. Е. и др. Ассоциации полиморфных вариантов генов *ADRA2A* и *ADRB3* с метаболическим синдромом у татар // *Генетика*. 2015. Т. 51. №7. С. 830. DOI: 10.7868/S0016675815070061
11. Трифонова Е. А., Попович А. А., Вагайцева К. В. и др. Метод мультиплексного генотипирования полиморфных вариантов генов, ассоциированных с ожирением и индексом массы тела // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 10. С. 1218–1230. DOI:10.1134/S001667581910014X
12. Raskiliene A., Smalinskiene A., Kriaucioniene V. et al. Associations of *MC4R*, *LEP*, and *LEPR* polymorphisms with obesity-related parameters in childhood and adulthood // *Genes (Basel)*. 2021. V. 12. № 6. DOI:10.3390/genes12060949
13. Иевлева К. Д., Баирова Т. А., Шенеман Е. А. и др. Вклад носительства полиморфных локусов генов энергетического обмена в метаболические нарушения у подростков двух этнических групп с избыточной массой тела // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2021. Т. 172. № 10. С. 440–444. DOI:10.47056/0365-9615-2021-172-10-440-444
14. Кочетова О. В., Шангареева З. А., Викторова Т. В. и др. Ассоциация вариантов генов *LEP* rs2167270, *LEPR* rs1137100, *GHRL* rs696217, rs27647 и *NPY* rs16147 с ожирением и пищевым поведением подростков: исследование «случай–контроль» // *Вопросы современной педиатрии*. 2022. Т. 21. № 3. С. 242–252. DOI:10.15690/vsp.v21i3.2428
15. Valladares M., Obregón A. M., Weisstaub G. et al. Association between feeding behavior, and genetic polymorphism of leptin and its receptor in obese Chilean children // *Nutricion Hospitalaria*. 2015. V. 31. № 3. P. 1044–1051. DOI:10.3305/nh.2015.31.3.8049
16. Баирова Т. А., Бальжиева В. В., Аюрова Ж. Г. и др. Соотношение талии к росту – важный антропометрический дискриминатор метаболических нарушений у подростков с избыточной массой тела и ожирением: пилотное исследование // *Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского*. 2022. Т. 101. № 5. С. 32–42. DOI:10.24110/0031-403X-2022-101-5-32-42
17. Баирова Т. А., Ершова О. А., Самбялова А. Ю. и др. Секвенирование фрагмента гена лептина у подростков с разным статусом веса // *Acta Biomedica Scientifica*. 2023. Т. 8. № 4. С. 92–100. DOI:10.29413/ABS.2023-8.4.10
18. Новикова Е. А., Рычкова Л. В., Погодина А. В. и др. Ожирение у подростков, рожденных путем кесарева сечения. Вопросы детской диетологии. 2021. Т. 19. № 6. С. 26–33. DOI:10.20953/1727-5784-2021-6-26-33
19. Бочарова О. В., Теплякова Е. Д. Ожирение у детей и подростков – проблема здравоохранения XXI в. // *Казанский мед. журн.* 2020. Т. 101. № 3. С. 381–388. DOI:10.17816/KMJ2020-381
20. Labayen I., Ruiz J. R., Moreno L. A. et al. The effect of ponderal index at birth on the relationships between common *LEP* and *LEPR* polymorphisms and adiposity in adolescents // *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2011. V. 19. № 10. P. 2038–2045. DOI:10.1038/oby.2011.74
21. Brandl E. J., Frydrychowicz C., Tiwari A. K. et al. Association study of polymorphisms in leptin and leptin receptor genes with antipsychotic-induced body weight gain // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2012. V. 38. № 2. P. 134–141. DOI:10.1016/j.pnpb.2012.03.001
22. Boiko A. S., Pozhidaev I. V., Paderina, D. Z. et al. Gene polymorphisms of hormonal regulators of metabolism in patients with schizophrenia with metabolic syndrome // *Genes*. 2022. V. 13. № 5. DOI:10.3390/genes13050844
23. Salerno P. S. V., Bastos C. R., Peres A. et al. Leptin polymorphism rs3828942: Risk for anxiety disorders? // *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2021. V. 271. P. 1141–1148. DOI:10.1007/s00406-019-01051-8
24. Aouizerat B. E., Byun E., Pullinger C. R. et al. Sleep disruption and duration are associated with variants in genes involved in energy homeostasis in adults with HIV/AIDS // *Sleep Medicine*. 2021. V. 82. P. 84–95. DOI:10.1016/j.sleep.2020.08.028

## Targeted Sequencing of the *LEP* Gene in Various Ethnic Groups of Obese Adolescents

E. V. Belyaeva<sup>1, \*</sup>, T. A. Bairova<sup>1</sup>, O. A. Ershova<sup>1</sup>, A. Yu. Sambyalova<sup>1</sup>,  
V. V. Sinkov<sup>1</sup>, V. V. Balzhieva<sup>1</sup>, L. V. Rychkova<sup>1</sup>, L. I. Kolesnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia  
\*e-mail: belyeva\_irk@mail.ru

The gene encoding leptin (*LEP*) is otherwise called the obesity factor gene. It has been shown that polymorphic loci and mutations in the *LEP* gene can cause metabolic disorders and lead to obesity, as well as the development of various pathologies associated with obesity. The purpose of this study was to search for polymorphic variants of the *LEP* gene in groups of overweight and/or obese adolescents in ethnic samples of Russians and Buryats. The study involved 48 adolescents aged 11 to 17 years (average age  $14.27 \pm 2.09$  years) with different weight status: normal body weight and overweight and/or obesity. Of these, 21 were Russians and 27 were Buryats. The research methods included: assessment of the clinical status and anthropometric indicators; polymerase chain reaction (PCR) and sequencing using the Sanger method of a fragment of the *LEP* gene; bioinformatic analysis; statistical processing of the results obtained. In the study, amplification conditions were selected for a fragment of the *LEP* gene with a total length of 3878 bp. (128251456–128255334) and its sequencing was carried out. After bioinformatic processing of the obtained results, ten SNPs were found in the studied group of adolescents with different weight status, seven of them registered in the NCBI database and three replacements not previously registered in the NCBI. Of the seven polymorphisms registered in the NCBI, one SNP was identified in all study groups, three SNPs were identified in the main group, one of them in the Russian group, one in the Buryat group and one in both ethnic groups, and three SNPs were found only in the control group in Buryat adolescents. Three SNPs not registered with the NCBI were identified only in the overweight and/or obese adolescents group, including two in the Russian group chr7:128255051 (*G > C*), chr7:128255092 (*G > C*) and one in the Buryat group chr7:128254681 (*C > G*). The study characterized the frequency of SNPs identified as a result of sequencing of a fragment of the *LEP* gene in groups of adolescents with different weight status.

**Keywords:** leptin gene, sequencing, overweight, obesity, adolescents.

## АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОФОНДА РУССКИХ СТАРОЖИЛОВ АРКТИЧЕСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ЯКУТИИ ИЗ С. РУССКОЕ УСТЬЕ

© 2024 г. Т. В. Борисова<sup>1</sup>, А. В. Соловьев<sup>1</sup>, Г. П. Романов<sup>1</sup>, Ф. М. Терютин<sup>2</sup>,  
В. Г. Пшенникова<sup>2</sup>, Н. А. Барашков<sup>2</sup>, С. А. Федорова<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677013 Россия

<sup>2</sup>Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск, 677000 Россия

\*e-mail: sardanafedorova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.05.2024 г.

После доработки 03.06.2024 г.

Принята к публикации 07.06.2024 г.

В статье представлен анализ структуры митохондриального генофонда жителей с. Русское Устье. Спектр митохондриальных линий русскоустыинцев представлен восьмью гаплогруппами и характеризуется доминированием восточно-евразийских гаплогрупп С, D, G, F и M13, которые составили 66,7%. Минорными оказались западно-евразийские гаплогруппы HV, H и U (33,3%), среди которых преобладала редкая суб-гаплогруппа H2a, отсутствующая в соседних популяциях Восточной Сибири. Выявлено, что среди русских старожилов р. Индигирки H2 встречается с одной из самых высоких частот в мире (16,7%), образуя специфический кластер, дистанцированный от остальных H2a-линий, вероятно, сформировавшийся в результате эффекта основателя. Сохранность специфических материнских линий европейского происхождения в генофонде русскоустыинцев может являться одним из убедительных свидетельств в пользу существования более ранней волны заселения арктического побережья Якутии морским путем во второй половине XVI в. выходами из Поморья, еще до прихода казаков в XVII в.

*Ключевые слова:* русские старожилы, Русское Устье, мтДНК, Якутия, Восточная Сибирь.

DOI: 10.31857/S0016675824110074 EDN: WBEJNY

В с. Русское Устье Аллаиховского района Якутии, расположенном на побережье Северного Ледовитого океана, проживает особая группа русских старожилов – русскоустыинцы, которые издревле заселили крайний северо-восток Сибири. Несмотря на тесные контакты с соседними сибирскими народами, русские старожилы р. Индигирки сумели сохранить этническую самоидентификацию, язык, культурные и религиозные традиции [1, 2]. В особенности исследователи отмечают сохранность их уникального говора, близкого к говорам архангельских поморов и содержащего немало заимствований из языков народов Сибири [3]. Происхождение русскоустыинцев связывают с несколькими волнами заселения арктического побережья Якутии [1]. Согласно преданиям самих жителей села, они являются потомками семей новгородских поморов, прибывших на небольших парусных судах («кочи») в устье р. Индигирки во второй половине XVI в., задолго до основания казачьего острога в 1638 г. пешим отрядом Ивана Реброва [4]. Однако эта версия является гипотетической, и не

подтверждена официальными документами. Вторая и третья волны могли быть связаны с казаками и мигрантами из г. Зашиверска, упраздненного в 1820 г. из-за эпидемии оспы [1, 5]. Кроме того, исследователи не исключают вклад миграций с начала XVII в., связанных с освоением северо-востока Сибири промысловыми людьми [6].

Проведенный нами ранее анализ родовой структуры русскоустыинцев показал, что вплоть до настоящего времени жители с. Русское Устье подразделяются на «досельных» (коренные жители) и «пришлых» (некоренные жители). Около половины жителей села причисляют свои роды по отцовской линии к «досельным», из которых 43,5% относят себя к потомкам поморов, а 6,5% – к потомкам казаков [7]. К «пришлым» причисляют свои роды остальные 50% жителей села, из которых 37,1% являются потомками жителей упраздненного г. Зашиверска и 12,9% связывают свои роды с более поздними миграциями [7]. Последующее исследование происхождения русскоустыинцев по данным линий Y-хромосомы продемонстрировало

преобладание суб-гаплогруппы N3a4-Z1936 у «досельных» жителей села, причисляющих себя к потомкам поморов (85,7%) [8, 9]. Линия Y-хромосомы N3a4-Z1936 в славянских популяциях Русской равнины встречается с минорными частотами (2,5%), а на территории Русского Севера (Новгородская и Архангельская области) ее частота становится несколько выше (от 9,4 до 22,6% соответственно), приближаясь к более высоким частотам, характерным для соседних финно-угорских популяций Карелии (20,1%) и Финляндии (41%) [10, 11]. На основании полученных данных нами было высказано предположение о поморском происхождении линии N3a4-Z1936 Y-хромосомы у жителей с. Русское Устье [9].

Первые исследования митохондриального генофонда русских старожилов полярного севера Восточной Сибири с. Русское Устье, с. Походск и с. Марково, проведенные под руководством Р.И. Сукурника, показали почти полное замещение материнских линий сибирскими (от 90,7 до 100%) [12]. Исключение составили только жители с. Русское Устье, у которых были обнаружены западно-евразийские линии H2a и U4a1 с суммарной частотой 9,3% (3 из 32) [12]. У одного коренного жителя с. Русское Устье с суб-гаплогруппой H2a был проведен анализ митогенома, который позволил установить редкий набор мутаций в позициях 73, 4350, 5460 и 8709, не встречающийся в других популяциях Европы, а возраст коалесценции данной линии был оценен в  $15,32 \pm 3,39$  тыс. лет [12]. Полученные результаты были интерпретированы в пользу уникальности суб-гаплогруппы H2a, появление которой на арктическом побережье Якутии могло быть связано с выходцами из Поморья [12].

В связи с вышеизложенным в настоящей работе проведен углубленный анализ митохондриального генофонда жителей с. Русское Устье.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования в ходе экспедиций в 2018–2019 гг. были получены сведения о родословных и образцы ДНК неродственных жителей с. Русское Устье ( $n = 17$ ) и выходцев из этого села, проживающих в настоящее время в соседнем п. Чокурдах ( $n = 13$ ), административном центре Аллаиховского района Якутии. Средний возраст участников исследования составил  $46 \pm 19,26$  лет (от 7 до 81 года). По данным Всероссийской переписи населения 2020 г., в с. Русское Устье насчитывается всего 99 человек [13].

Все образцы ДНК были гаплотипированы методом ПЦР-ПДРФ с использованием оригинальных последовательностей праймеров, подобранных с использованием программного обеспечения Primer-BLAST [14]: 10394BstDEI+, 10397AluI+ (для гаплогрупп C, D и G) [15], 13263G, 14318C (для

гаплогруппы C), 5178A (для гаплогруппы D), 4833G (для гаплогруппы G), 12406A (для гаплогруппы F), 14766C (для гаплогруппы HV), 1438A (для гаплогруппы H2), 4769A (для гаплогруппы H2a), 12308G (для гаплогруппы U). Идентификация линий мтДНК была проведена с помощью секвенирования фрагментов, включающих гипервариабельные сегменты I и II (ГВСI и ГВСII) по методу Сэнгера. Использованная номенклатура гаплогрупп соответствовала PhyloTree.org – mtDNA tree Build 17 (18 Feb 2016) [16].

Филогенетическое дерево линии гаплогруппы H2a было построено с использованием метода невзвешенных парных групп со средним арифметическим (UPGMA) [17] в программе MEGA11 [18]. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального полного правдоподобия [19]. Филогенетический анализ был проведен на выборке, которая включала 51 образец мтДНК (16028–181), размером 723 пар нуклеотидов (п. н.). Все включенные в анализ последовательности принадлежали к гаплогруппе H2a. В выборку были включены: один реконструированный эталонный митогеном (RSRS) [20], пять образцов из с. Русское Устье, 30 современных образцов из базы данных GenBank [21] и 15 древних образцов из базы данных AmtDB [22].

Оценка времени дивергенции суб-гаплогруппы H2a русскоустыинцев по данным полиморфизма гипервариабельных сегментов I и II мтДНК (16024–16365, 73–340) была проведена по [23–30].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Разнообразие гаплогрупп мтДНК*

В ходе проведенного исследования у 30 неродственных жителей с. Русское Устье было обнаружено 14 митохондриальных линий, которые относятся к 8 гаплогруппам: C, D, G, F, M13, HV, H и U (табл. 1). Спектр митохондриальных гаплогрупп русскоустыинцев характеризуется доминированием восточно-евразийских линий C, C4a1a1, C4a2a1, C5a2, D, D4i, F1b, G1b1 и M13a1b, составляющих две трети общей выборки 66,7% (20/30), в то время как частота западно-евразийских линий HV, H2a, U2e, U4a1, U4a2b составила 33,3% (10/30).

В митохондриальном генофонде русскоустыинцев наиболее частыми являются гаплогруппы C и D, которые вместе составили почти половину всех идентифицированных линий мтДНК (43,3%; 13/30). Третьей по частоте была гаплогруппа H (16,7%; 5/30), которая в исследованной выборке представлена всего одной суб-гаплогруппой H2a (5/5), на которую приходится 50% всех идентифицированных у русскоустыинцев западно-евразийских линий (см. табл. 1).



**Таблица 1.** Разнообразие гаплогрупп мтДНК 30 неродственных жителей с. Русское Устье

№	Гаплогруппа	Число (%)	Отличия от rCRS в мтДНК (16000-16519 и 73-489)	Маркерные позиции в кодирующем районе
Восточно-евразийские гаплогруппы		20 (66,7%)		
C		7 (23,3%)		
1	C	4 (13,4)	<b>16223 16298 16327</b> 16519 73 199 249d <b>263 489</b>	10400T 14318C
2	C4a1a1	1 (3,3)	<b>16093 16129 16223 16327</b> 16519 73 195 249d <b>263 489</b>	
3	C4a2a1	1 (3,3)	<b>16171 16223 16298 16327 16344 16357</b> 16519 73 199 249d <b>263 489</b>	
4	C5a2	1 (3,3)	<b>16093</b> 16189 <b>16223 16261 16288 16298</b> 16519 73 249d <b>263 489</b>	
D		6 (20%)		
5	D	2 (6,7)	16189 <b>16223 16362 73 150 263 489</b>	5178A 10400T
		1 (3,3)	16093 16214 <b>16223 16362 73 263 489</b>	
6	D4i	3 (~ 10)	<b>16223 16294 16362 73</b> 146 195 200 <b>263 489</b>	4833G 5178A 10400T
F		2 (6,7%)		
7	F1b	2 (6,7)	16183 <b>16189 16232A 16249 16304</b> 16311 16519 73 249d <b>263 489</b>	12406A
G		4 (13,3%)		
8	G1b1	3 (~ 10)	<b>16017 16129 16223</b> 16519 73 207 <b>263 489</b>	4833G 10400T
		1 (3,3)	<b>16017</b> 16093 <b>16129 16223</b> 16519 73 207 <b>263 489</b>	
M13		1 (3,3%)		
9	M13a1b	1 (3,3)	<b>16145 16148</b> 16162 <b>16188 16189</b> <b>16223 16381 73 152 263 489</b>	10400T
Западно-евразийские гаплогруппы		10 (33,3%)		
HV		2 (6,7%)		
10	HV	2 (6,7)	16519 <b>263</b>	14766C
H		5 (16,7%)		
11	H2a	3 (~ 10)	<b>73 263</b>	1438A 4769A 14766C
		2 (6,7)	16202 16467 <b>73 263</b>	
U		3 (~10%)		
12	U2e	1 (3,3)	<b>16129</b> 16168 <b>16189 16362 73</b> 146 <b>152 263</b>	12308G
13	U4a1	1 (3,3)	<b>16134</b> 16311 <b>16356 73 152 195 263</b> 372	
14	U4a2b	1 (3,3)	16192 <b>16223 16356</b>	
Всего		30 (100)		

Примечание. Жирным выделены диагностические позиции.

**Таблица 2.** Сравнение западно-евразийских гаплогрупп жителей с. Русское Устье по происхождению родов

Гаплогруппы	«Досельные»	«Пришлые»	Недифференцированные
HV	–	–	2 (100%)
H2a	5 (100%)	–	–
U2e	1 (100%)	–	–
U4a1	–	–	1 (100%)
U4a2b	–	1 (100%)	–

*Генеалогический анализ жителей с. Русское Устье с западно-евразийскими гаплогруппами мтДНК*

Генеалогический анализ жителей с. Русское Устье с западно-евразийскими гаплогруппами был проведен на глубину трех поколений (табл. 2). Большинство русскоустыинцев (9/10) с гаплогруппами HV, H2a, U2e и U4a1 причисляли свои роды по материнской линии к «досельным», и только один носитель гаплогруппы U4a2b – к «пришлым» (период СССР). Несмотря на то, что носители гаплогрупп HV и U4a1 причисляли себя к «досельным», мы не смогли однозначно дифференцировать происхождение их родов по материнской линии, поэтому к «досельным» жителям села были отнесены только носители гаплогрупп H2a и U2e (см. табл. 2).

*Филогенетический анализ суб-гаплогруппы H2a по данным полиморфизма фрагмента мтДНК (16028-181), включающего гипервариабельные сегменты I и II*

Филогенетический анализ показал, что H2a-линии жителей с. Русское Устья дифференцировались друг от друга, образовав отдельный кластер, ближе к корню дерева, рядом с древними образцами из археологических стоянок Венгрии и Литвы, и дистанцировались от современных европейских линий (рис. 1). Вероятно, H2a-линии русскоустыинцев достаточно давно дивергировали от предковой линии, и реконструированное филогенетическое дерево демонстрирует независимую эволюцию митохондриальных линий H2a у русских старожилов арктического побережья Якутии.

*Оценка времени дивергенции суб-гаплогруппы H2a русскоустыинцев по данным анализа полиморфизма ГВС1 и II мтДНК*

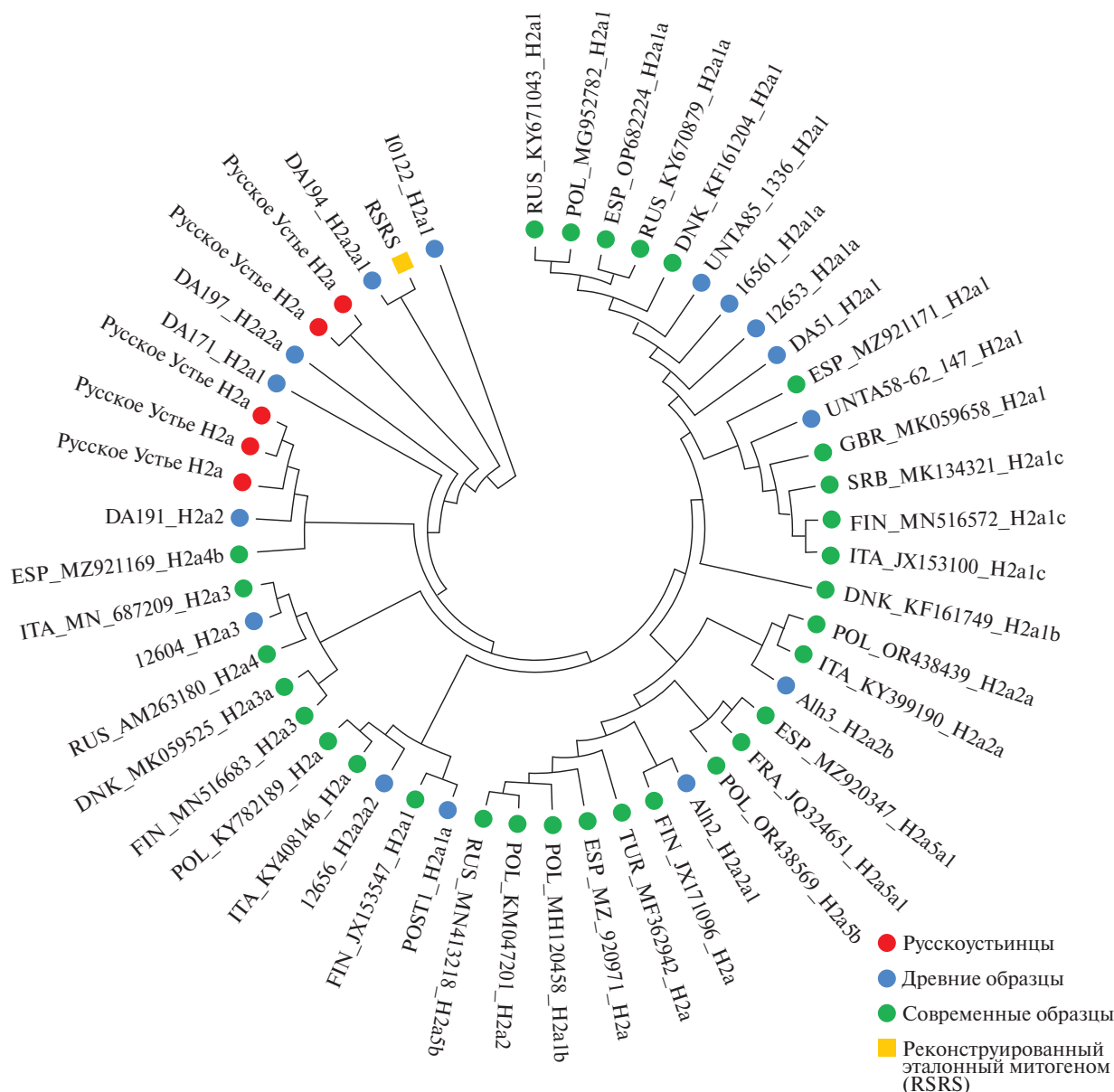
По известным оценкам скорости мутирования ГВС1 мтДНК [23–29] было рассчитано время дивергенции линий суб-гаплогруппы H2a русскоустыинцев, которое варьировало от 660 до 9058 лет (табл. 3).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ митохондриального генофонда жителей с. Русское Устье продемонстрировал специфическое соотношение восточно- и западно-евразийских митохондриальных гаплогрупп – 66,7% и 33,3% соответственно. Доминирующие восточно-евразийские линии жителей с. Русское Устье представлены характерными для популяций Восточной Сибири гаплогруппами C, D, G, F и M13 [37–44]. Широкое разнообразие спектра сибирских гаплогрупп отражает вклад местного населения в формирование митохондриального генофонда русскоустыинцев, главным образом юкагиров, и, по-видимому, в меньшей степени эвенов, чукчей и якутов [12].

Установленная в настоящей работе частота западно-евразийских линий митохондриального генофонда у жителей с. Русское Устье (33,3%) в 2 раза превышает значение частоты, ранее выявленной в работе Р.И. Сукерник и соавт. (9,3%) [12]. При этом спектр выявленных западно-евразийских гаплогрупп (HV, H и U) характеризуется преобладанием одной редкой суб-гаплогруппы – H2a, на которую пришлось 50% всех западно-евразийских линий мтДНК (см. табл. 1).

Анализ распространенности гаплогруппы H2 в Евразии показал ее присутствие с частотами, превышающими 10% не только в европейской части континента (Финляндия – 10,4% [37], Румыния – 12,5% [45], Великобритания – 14,9% [46], Босния и Герцеговина – 17,6 и 24,4% [47]), но и на арктическом побережье Якутии, среди популяции русских старожилов – 16,7% (рис. 2). Высокая частота относительно редкой гаплогруппы H2 у жителей с. Русское Устье, вероятно, обусловлена эффектом основателя, поскольку в отличие от гаплогруппы U, которая представлена тремя различными суб-гаплогруппами (U2e, U4a1, U4a2b), гаплогруппа H представлена филогенетически близкими линиями, относящимися к одной субгаплогруппе – H2a, которая была выявлена у пяти не связанных близким родством «досельных» жителей села, причисляющих себя к потомкам выходцев из Поморья (см. табл. 2).



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево, построенное методом UPGMA по данным полиморфизма фрагмента 16028–181 мтДНК, включающего ГВС1 и II мтДНК (51 образец). Один сайт дивергенции между образцами был рассчитан с применением теста относительной скорости эволюции на основе критерия  $\chi^2$  [30]. Между образцами русскоустынцев было выявлено наличие одного сайта дивергенции ( $\chi^2 = 4,5$ ;  $p < 0,05$ ). Древние образцы: Alh\_2, Alh\_3 – образцы из стоянки Альтхайм (Andreasweg) на территории современной Баварии на юге Германии, в основном датируемые примерно 500 г. до н.э. [31]. DA171 – древний образец из стоянки на территории современной Литвы, датируемый 1800–1500 гг. до н.э. (железный век); DA191, DA194 и DA197 – образцы из стоянок на территории современной Венгрии, датируемые 2409, 2322 и 2378 гг. до н.э. соответственно (железный век); DA51 – образцы из археологических раскопок на территории Тянь-Шаня, датируемые 2220 г. до н.э. [32]. I0122 – древний образец из археологического могильника Хвалынск II (Самарская область, Россия), датированный 5200–4000 гг. до н.э. (бронзовый век) [33]. I2604 – древний образец из захоронения близ Бартон Стейси (Гэмпшир, Англия), датированный 2210–2030 гг. до н.э. (бронзовый век); I2653, I2656 – древние образцы из захоронения в Восточном Лотиане (Шотландия), датированные 1500–1300 и 1279–980 гг. до н.э. (бронзовый век) соответственно [34]. I6561 – древний образец из захоронения близ Александрии (Украина), датированный 4045–3974 гг. до н.э. (Неолит) [35]. POST\_1 (Haunstetten – Postillionstraße), UNTA58-62\_147, UNTA85-1336 (Haunstetten – Unterer Talweg) – древние образцы из захоронения в долине р. Лех, к югу от г. Аугсбург (Бавария, Германия), датированные 2024–1882, 2031–1900 и 2465–2300 гг. до н.э. соответственно (бронзовый век) [36]. Современные образцы: DNK – из Дании, ESP – из Испании, FIN – из Финляндии, FRA – из Франции, GBR – из Великобритании, ITA – из Италии, POL – из Польши, RUS – из России, SRB – из Сербии, TUR – из Турции.

**Таблица 3.** Скорость мутирования в ГВС1 и II мтДНК по данным разных авторов

№	Скорость мутирования ГВС1 и II мтДНК за одно поколение	Время замены одного нуклеотида в ГВС1 и II мтДНК (16024–16365 и 57–372), лет	Ссылка
1	0,0303	660	[23]
2	0,0277	720	[24]
3	0,0042	4700	[25]
4	0,0052	3810	[26]
5	0,0054	3700	[27]
6	0,0032	6135	[28]
7	0,0022	9058	[29]

Примечание. Одно поколение составляет 20 лет.



**Рис. 2.** Географическое распределение гаплогруппы H2 в Евразии [47–69].

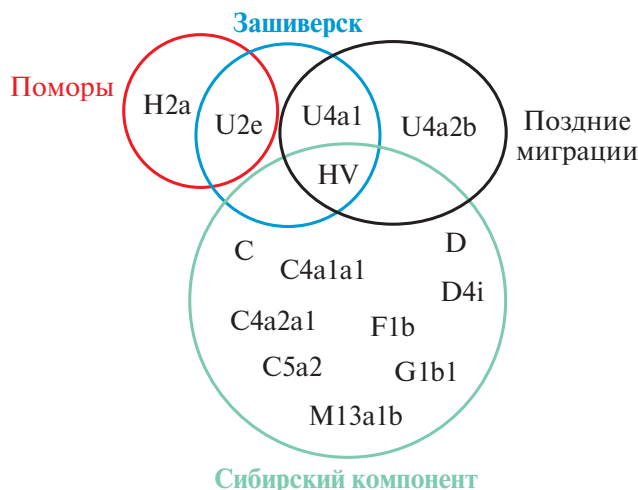
В связи с этим нами проведен филогенетический анализ линий суб-гаплогруппы H2a по данным анализа полиморфизма фрагмента 16028-181 мтДНК, включающего ГВС1 и II мтДНК в выборке из 51 современного и древнего образцов. Установлено, что все пять русскоустыинцев кластеризовались в корне филогенетического дерева, вместе с архаичными образцами, что может свидетельствовать о достаточно ранней дивергенции H2a-ветви русскоустыинцев от современного общеевропейского H2a-пула (см. рис. 1). Оценка времени дивергенции H2a-линий русскоустыинцев варьировала от 660 до 9058 лет (табл. 3), что свидетельствует о достаточно длительном времени независимой эволюции данной H2a-ветви у русскоустыинцев. Полученные датировки не соответствуют времени

появления казаков в Восточной Сибири в XVII в. и больше согласуются с ранее выдвинутой версией о вероятном поморском происхождении H2a у жителей с. Русское Устье [12].

Связь происхождения митохондриальных гаплогрупп русскоустыинцев с основными волнами заселения с. Русское Устье, по данным генеалогий материнских родов, представлена на рис. 3.

В целом полученные данные свидетельствуют о наличии специфических митохондриальных линий западно-евразийского происхождения в генофонде русскоустыинцев, что согласуется с ранее полученными данными по маркерам Y-хромосомы (N3a4-Z1936 – 85,7%) и широкогеномного анализа 740000 SNP (равное соотношение европейского и





**Рис. 3.** Связь происхождения митохондриальных гаплогрупп русскоустыинцев с основными волнами заселения с. Русское Устье по данным генеалогии материнских родов. Поморья: с выходцами из Поморья могут быть связаны суб- гаплогруппы H2a и U2e. Сибирский компонент: C, C4a1a1, C4a2a1, C5a2, D, D4i, F1b, G1b1 и M13a1b. Поздние миграции: по результатам генеалогии материнских родов из западно-евразийских линий, однозначно только суб-гаплогруппа U4a2b была связана с поздними миграциями (период СССР), не исключено, что с поздними миграциями также могут быть связаны линии HV и U4a1. Зашиверск: суб-гаплогруппы HV, U2e и U4a1 могли быть привнесены на арктическое побережье Якутии как вместе с русскоязычным населением упраздненного г. Зашиверск, так и в последующие исторические периоды. Суб-гаплогруппа HV может быть связана не только с русскоязычным населением, но и с местным автохтонным компонентом, поскольку ранее была обнаружена в популяциях Восточной Сибири [43, 44, 69].

сибирского компонента) [9]. Фактически сохранность западно-евразийских линий мтДНК в генофонде русскоустыинцев является наиболее убедительным свидетельством в пользу существования более ранней волны заселения арктического побережья Якутии, выходцами из Поморья в конце XVI в. [1, 3, 4, 7, 9]. Поскольку, в отличие от линии N3a4-Z1936 Y-хромосомы русских старожилов Якутии [9], появление которой на территории Восточной Сибири в том числе могло быть связано с казачьими отрядами и промысловыми людьми, в XVII в. представленными исключительно мужчинами [70], обнаруженный специфический кластер линии H2a ДНК, как это ни удивительно, полностью согласуется с преданиями о том, что предки русскоустыинцев, спасаясь от опричнины Ивана Грозного, на легких парусных судах вместе с женщинами, детьми, скарбом и даже домашними животными сумели преодолеть тяжелый путь

странствий вдоль Северного Ледовитого океана – от Белого до Восточно-Сибирского моря [1].

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2023-0003) и НИР ЯНЦ КМП «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии в популяциях Республики Саха (Якутия)».

Исследование было одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике Якутского научного центра комплексных медицинских проблем, Якутск, Россия (протокол № 4 от 01.03.2018 г.).

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексее А. Н. Первые русские поселения XVII–XVIII вв. на северо-востоке Якутии. Новосибирск: Изд-во Института археологии и этнографии СО РАН, 1996. 151 с.
2. Никитина С. Е. Русские арктические старожилы Республики Саха (Якутия): проблемы сохранения уникальной культуры // Русские арктические старожилы Якутии: Сб. науч. статей. Якутск: ИГИ-ИПМНС, 2019. С. 16–33.
3. Васильев В. Л. К вопросу о связях севернорусских говоров с говором села Русское Устье на северо-востоке Якутии // Севернорусские говоры. № 16. С. 63–75. СПб.: Нестор-История, 2017.
4. Чикачев А. Г. Русские на Индигирке: Историко-этнографический очерк. Новосибирск: Новосибир. отд. изд-ва «Наука», 1990. 189 с.
5. Окладников А. П., Гоголев З. В., Ащепков Е. А. Древний Зашиверск. Древнерусский заполярный город. Москва: Наука, 1977. 212 с.
6. Строгова Е. А. Формирование постоянного русского населения и образование этнической территории на севере Якутии в XVII–XVIII вв. // Русские арктические старожилы Якутии: Сб. науч. статей. Якутск: ИГИИПМНС, 2019. С. 7–15.
7. Solovyev A. V., Borisova T. V., Cherdonova A. M. et al. The Russian old-settlers in the arctic coast of Eastern Siberia: Family name diversity in the context of their origin. // Sustainability. 2021. №13. P. 10895. <https://doi.org/10.3390/su131910895/>

8. *Борисова Т. В., Соловьев А. В., Чердонова А. М. и др.* Анализ линий Y-хромосомы русских старожиллов арктического побережья Якутии из села Русское Устье // *Якутский мед. журн.* 2022. № 3(79). С. 74–77. DOI: 10.25789/YMJ.2022.79.19
9. *Соловьев А. В., Борисова Т. В., Романов Г. П. и др.* Генетическая история русских старожиллов арктического побережья Якутии из с. Русское Устье по данным Y-хромосомы и широкогеномного анализа // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 9. С. 1070–1077. DOI: 10.31857/S0016675823090114
10. *Plutäe A. M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al.* Human Y Chromosome Haplogroup N: A non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 99. № 1. P. 163–173. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.05.025
11. *Балановская Е. В., Агджоян А. Т., Схалыхо Р. А. и др.* Генофонд новгородцев: между севером и югом // *Генетика.* 2017. Т. 53. № 11. С. 1338–1348. DOI: 10.7868/S0016675817110029
12. *Сукерник Р. И., Володько Н. В., Мазунин И. О. и др.* Генетическая история русских старожиллов полярного севера Восточной Сибири по результатам анализа изменчивости мтДНК // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 11. С. 1571–1579.
13. [https://rosstat.gov.ru/vpn\\_popul](https://rosstat.gov.ru/vpn_popul)
14. *Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al.* Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* 2012. № 13. P. 134. DOI:10.1186/1471-2105-13-134
15. *Деренко М. В., Малярчук Б. А., Денисова Г. А. и др.* Полиморфизм диаллельных локусов Y-хромосомы у коренного населения Алтае-Саянского нагорья // *Генетика.* 2002. Т. 38. № 3. С. 393–399.
16. *van Oven M., Kayser M.* Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation // *Hum. Mutat.* 2009. V. 30. № 2. P. E386–E394. DOI:10.1002/humu.20921
17. *Sneath P., Sokal R.* Numerical taxonomy // *Nature.* 1962. № 193. P. 855–860. <https://doi.org/10.1038/193855a0>
18. *Tamura K., Stecher G., Kumar S.* Mega11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38. № 7. P. 3022–3027. DOI:10.1093/molbev/msab120
19. *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 30. P. 11030–11035. DOI:10.1073/pnas.0404206101
20. *Behar D. M., van Oven M., Rosset S. et al.* A «Copernican» reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 90. № 4. P. 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.002>
21. *Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K. et al.* GenBank // *Nucleic acids research (Database issue).* 2013. №41. D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
22. *Ehler E., Novotný J., Juras A. et al.* AmtdB: A database of ancient human mitochondrial genomes // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D29–D32. DOI:10.1093/nar/gky843
23. *Parsons T. J., Muniec D. S., Sullivan K. et al.* A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. № 4. P. 363–368. DOI:10.1038/ng0497-363
24. *Soodyall H., Jenkins T., Mukherjee A. et al.* The founding mitochondrial DNA lineages of Tristan da Cunha Islanders // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1997. V. 104. № 2. P. 157–166. DOI:10.1002/(SICI)1096-8644(199710)104:2<157::AID-AJPA2>3.0.CO;2-W
25. *Sigurðardóttir S., Helgason A., Gulcher J. R. et al.* The mutation rate in the human mtDNA control region // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 66. № 5. P. 1599–1609. DOI:10.1086/302902
26. *Heyer E., Zietkiewicz E., Rochowski A. et al.* Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: Study of control region mutations in deep-rooting pedigrees // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 69. № 5. P. 1113–1126. DOI:10.1086/324024
27. *Howell N., Smejkal C.B., Mackey D.A. et al.* The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: There is a difference between phylogenetic and pedigree rates // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. № 3. P. 659–670. DOI:10.1086/368264
28. *Santos C., Montiel R., Sierra B. et al.* Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: A model using families from the Azores Islands (Portugal) // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. № 6. P. 1490–1505. DOI: 10.1093/molbev/msi141
29. *Soares P., Ermini L., Thomson N. et al.* Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. V. 84. № 6. P. 740–759. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.05.001
30. *Tajima F.* Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis // *Genetics.* 1993. V. 135. № 2. P. 599–607. DOI:10.1093/genetics/135.2.599
31. *Veeramah K. R., Rott A., Groß M. et al.* Population genomic analysis of elongated skulls reveals extensive female-biased immigration in early medieval Bavaria // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 13. P. 3494–3499. DOI:10.1073/pnas.1719880115

32. *Damgaard P. d. B., Marchi N., Rasmussen S. et al.* 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes // *Nature*. 2018. № 557. P. 369–374. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0094-2>
33. *Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N. et al.* Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians // *Nature*. 2015. № 528. P. 499–503. <https://doi.org/10.1038/nature16152>
34. *Olalde I., Brace S., Allentoft M. et al.* The beaker phenomenon and the genomic transformation of northwest Europe // *Nature*. 2018. № 555. P. 190–196. <https://doi.org/10.1038/nature25738>
35. *Mathieson I., Alpaslan-Roodenberg S., Posth C. et al.* The genomic history of southeastern Europe // *Nature*. 2018. № 555. P. 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature25778>
36. *Knipper C., Mittnik A., Massy K. et al.* Female exogamy and gene pool diversification at the transition from the Final Neolithic to the Early Bronze Age in central Europe // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 38. P. 10083–10088. DOI:10.1073/pnas.1706355114
37. *Derbeneva O. A., Starikovskaya E. B., Wallace D. C., Sukernik R. I.* Traces of early Eurasians in the Mansi of northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. № 4. P. 1009–1014. DOI:10.1086/339524
38. *Derenko M. V., Grzybowski T., Malyarchuk B. A. et al.* Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia // *Ann. Hum. Genet.* 2003. V. 67. № 5. P. 391–411. DOI:10.1046/j.1469-1809.2003.00035.x
39. *Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al.* Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 5. P. 1025–1041. DOI:10.1086/522933
40. *Yao Y. G., Kong Q. P., Wang C. Y. et al.* Different matrilineal contributions to genetic structure of ethnic groups in the Silk Road region in China // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 12. P. 2265–2280. DOI:10.1093/molbev/msh238
41. *Kong Q. P., Yao Y. G., Sun C. et al.* Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 73. № 3. P. 671–676. DOI:10.1086/377718
42. *Pakendorf B., Wiebe V., Tarskaia L. A. et al.* Mitochondrial DNA evidence for admixed origins of central Siberian populations // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2003. V. 120. № 3. P. 211–224. DOI:10.1002/ajpa.10145
43. *Федорова С. А., Бермишева М. А., Виллемс Р. и др.* Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // *Мол. биология*. 2003. V. 37. P. 643–653.
44. *Fedorova S.A., Reidla M., Metspalu E. et al.* Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): Implications for the peopling of north-east Eurasia // *BMC Evol. Biol.* 2013. V. 13. P. 127. DOI:10.1186/1471-2148-13-127
45. *Cocoş R., Schipor S., Hervella M. et al.* Genetic affinities among the historical provinces of Romania and central Europe as revealed by an mtDNA analysis // *BMC Genet.* 2017. V. 18. № 1. P. 20. DOI:10.1186/s12863-017-0487-5
46. *Yonova-Doing E., Calabrese C., Gomez-Duran A. et al.* An atlas of mitochondrial DNA genotype-phenotype associations in the UK biobank // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. № 7. P. 982–993. DOI: 10.1038/s41588-021-00868-1
47. *Mujkić I., Ahmić A., Lasić L. et al.* The mitochondrial landscape of the Konjuh and Majeвица mountains of northeastern Bosnia: The view in the context genetic and demographic history // *Genetics & Applications*. 2020. V. 6. № 2. P. 18–30. <https://doi.org/10.31383/ga.vol6iss2ga02>
48. *Čoklo M., Auguštin D. H., Šarac J. et al.* Diversity of Y-chromosomal and mtDNA markers included in mediscop chip within two Albanian subpopulations from Croatia and Kosovo: preliminary data // *Coll. Antropol.* 2016. V. 40. № 3. P. 195–198.
49. *Roostalu U.* Towards the understanding of the origin of human genetic variation in Eurasia: mtDNA haplogroup H in the Caucasus: Research master's degree. Univ. of Tartu, 2004.
50. *Brandstätter A., Zimmermann B., Wagner J. et al.* Timing and deciphering mitochondrial DNA macro-haplogroup R0 variability in Central Europe and Middle East // *BMC Evol. Biol.* 2008. № 8. P. 191. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-191>
51. *Kushniarevich A., Sivitskaya L., Danilenko N. et al.* Uniparental genetic heritage of Belarusians: Encounter of rare middle eastern matrilineages with a central European mitochondrial DNA pool // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 6. P. e66499. DOI:10.1371/journal.pone.0066499
52. *Sarac J., Sarić T., Auguštin D.H. et al.* Maternal genetic heritage of southeastern Europe reveals a new Croatian isolate and a novel, local sub-branching in the X2 haplogroup // *Ann. Hum. Genet.* 2014. V. 78. № 3. P. 178–194. DOI: 10.1111/ahg.12056
53. *Malyarchuk B., Skonieczna K., Duleba A. et al.* Mitogenomic diversity in Czechs and Slovaks // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2022. № 59. P. 102714. DOI:10.1016/j.fsigen.2022.102714
54. *Bybjerg-Grauholm J., Hagen C. M., Gonçalves V. F. et al.* Complex spatio-temporal distribution and genomic ancestry of mitochondrial DNA haplogroups in 24,216 Danes // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 12. P. e0208829. DOI: 10.1371/journal.pone.0208829



55. *Stoljarova M., King J. L., Takahashi M. et al.* Whole mitochondrial genome genetic diversity in an Estonian population sample // *Int. J. Legal Med.* 2016. V. 130. №1. P. 67–71.  
DOI:10.1007/s00414-015-1249-4
56. *Loogväli E. L., Roostalu U., Malyarchuk B. A. et al.* Disuniting uniformity: A pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 11. P. 2012–2021.  
DOI:10.1093/molbev/msh209
57. *Irwin J., Saunier J., Strouss K. et al.* Mitochondrial control region sequences from northern Greece and Greek Cypriots // *Int. J. Legal Med.* 2008. V. 122. № 1. P. 87–89.  
DOI:10.1007/s00414-007-0173-7
58. *Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G. et al.* Whole mitochondrial genome diversity in two Hungarian populations // *Mol. Genet. Genomics.* 2018. V. 293. № 5. P. 1255–1263.  
DOI:10.1007/s00438-018-1458-x
59. *Roostalu U., Kutuev I., Loogväli E.L. et al.* Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: The Near Eastern and Caucasian perspective // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 2. P. 436–448.  
DOI:10.1093/molbev/msl173
60. *Pliss L., Tambets K., Loogväli E.L. et al.* Mitochondrial DNA portrait of Latvians: Towards the understanding of the genetic structure of Baltic-speaking populations // *Ann. Hum. Genet.* 2006. V. 70. № 4. P. 439–458  
DOI:10.1111/j.1469-1809.2005.00238.x
61. *Kasperaviciute D., Kucinskas V., Stoneking M.* Y chromosome and mitochondrial DNA variation in Lithuanians // *Ann. Hum. Genet.* 2004. V. 68. № 5. P. 438–452.  
DOI:10.1046/j.1529-8817.2003.00119.x
62. *Mielnik-Sikorska M., Daca P., Malyarchuk B. et al.* The history of Slavs inferred from complete mitochondrial genome sequences // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. P. e54360. DOI:10.1371/journal.pone.0054360
63. *Marques S. L., Goios A., Rocha A.M. et al.* Portuguese mitochondrial DNA genetic diversity—an update and a phylogenetic revision // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. № 15. P. 27–32.  
DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.10.004
64. *Malyarchuk B., Litvinov A., Derenko M. et al.* Mitogenomic diversity in Russians and Poles // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2017. №30. P. 51–56.  
doi:10.1016/j.fsigen.2017.06.003
65. *Davidovic S., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al.* Complete mitogenome data for the Serbian population: The contribution to high-quality forensic databases // *Int. J. Legal Med.* 2020. V. 134. № 5. P. 1581–1590.  
DOI: 10.1007/s00414-020-02324-x
66. *Zupan A., Hauptman N., Glavač D.* The maternal perspective for five Slovenian regions: The importance of regional sampling // *Ann. Hum. Biol.* 2016. V. 43. № 1. P. 57–66.  
DOI: 10.3109/03014460.2015.1006678
67. *Hernández C. L., Dugoujon J. M., Novelletto A. et al.* The distribution of mitochondrial DNA haplogroup H in southern Iberia indicates ancient human genetic exchanges along the western edge of the Mediterranean // *BMC Genet.* 2017. № 18. P. 46.  
<https://doi.org/10.1186/s12863-017-0514-6>
68. *Lappalainen T., Hannelius U., Salmela E. et al.* Population structure in contemporary Sweden— a Y-chromosomal and mitochondrial DNA analysis // *Ann. Hum. Genet.* 2009. V. 73. № 1. P. 61–73.  
DOI: 10.1111/j.1469-1809.2008.00487.x
69. *Derenko M. V., Malyarchuk B. A., Denisova G. A. et al.* Molecular genetic differentiation of the ethnic populations of South and East Siberia based on mitochondrial DNA polymorphism // *Rus. J. Genet.* 2002. V. 38. P. 1196–1202.  
<https://doi.org/10.1023/A:1020661022901>
70. *Фишер И.* Сибирская история с самого открытия Сибири до завоевания сей земли Российским оружием. СПб.: Имп. Акад. наук, 1774. 632 с.



## **Analysis of the Structure of the Mitochondrial Gene Pool of Russian Old-Settlers of the Arctic Coast of Yakutia from Village Russkoye Usty'e**

**T. V. Borisova<sup>1</sup>, A. V. Solovyev<sup>1</sup>, G. P. Romanov<sup>1</sup>, F. M. Teryutin<sup>2</sup>,  
V. G. Pshennikova<sup>2</sup>, N. A. Barashkov<sup>2</sup>, S. A. Fedorova<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>*Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677013 Russia*

<sup>2</sup>*Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems, Yakutsk, 677000 Russia*

*\*e-mail: sardanafedorova@mail.ru*

In this study analysis of the mitochondrial gene pool of residents of the village Russkoye Usty'e was carried out. It was revealed that the spectrum of mitochondrial lines of the Russian old-settlers is represented by 8 haplogroups and is characterized by the dominance of East-Eurasian lineages C, D, G, F and M13, which amounted to 66.7%. The West-Eurasian lineages HV, H and U (33.3%) were minor, which predominated the rare sub-haplogroup H2a. It was revealed that among Russian old-settlers, the H2 lineages occurs with one of the highest frequencies in the world (16.7%), forming a specific cluster, distant from the other European H2a-lineages, probably formed as a result of a founder effect. The preservation of specific maternal lineages in the gene pool of the Russian old-settlers may be one of the convincing evidence in favor of the existence of an earlier by sea wave of settlement of the Arctic coast of Yakutia by Pomorians in XVI c., before the arrival of the Cossacks in XVII c.

**Keywords:** Russian old-settlers, Russkoye Usty'e, mtDNA, Yakutia, Eastern Siberia.

## ЭКСПРЕССИЯ микроРНК miR-29A, miR-30C И miR-150 В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. М. А. Янишевская<sup>1, \*</sup>, Е. А. Блинова<sup>1, 2</sup>, А. В. Аклеев<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, Челябинск, 454141 Россия

<sup>2</sup>Челябинский государственный университет, Челябинск, 454001 Россия

\*e-mail: yanishevskaya@urcrm.ru

Поступила в редакцию 08.05.2024 г.

После доработки 27.05.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

С каждым годом все больше данных демонстрируют, что уровни экспрессии микроРНК могут быть значительно изменены после острого радиационного воздействия, а сами микроРНК играют важную роль в клеточном ответе на ионизирующее излучение. Однако регуляция экспрессии микроРНК после хронического радиационного воздействия в диапазоне малых и средних доз мало изучена. В настоящей работе методом ПЦР в реальном времени проведен анализ экспрессии зрелых микроРНК miR-29a, miR-30c, miR-150 в цельной крови у 81 человека в отдаленные сроки после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия. Средний возраст обследуемых людей составил 72 года, накопленные дозы облучения красного костного мозга (ККМ), а также тимуса и периферических лимфоидных органов находились в диапазоне от 2,13 до 1867,55 мГр и от 0,18 до 488,79 мГр соответственно. Спустя более 70 лет после начала радиационного воздействия у облученных людей обнаружено статистически значимое, зависимое от накопленной дозы облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов, снижение экспрессии микроРНК miR-30c.

**Ключевые слова:** микроРНК, экспрессия, ПЦР-РВ, р. Теча, низкоинтенсивное хроническое облучение, радиационное воздействие.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110085 **EDN:** WBDBLQ

В течение трех последних десятилетий активно исследуются некодирующие РНК, в частности микроРНК, способные контролировать широкий спектр биологических процессов посредством посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [1]. Оказывая влияние на дестабилизацию мРНК и/или репрессию трансляции, микроРНК играют определенную роль в патогенезе различных заболеваний, контролируя экспрессию более половины всех мРНК человека [2]. В дополнение к исследованиям по поиску связи микроРНК с различными патологическими состояниями было установлено изменение уровней экспрессии микроРНК при воздействии ионизирующего излучения (ИИ).

В контексте ответа микроРНК на радиационное воздействие уже сегодня существует множество данных, полученных преимущественно в результате исследований *in vitro*, описывающих радиосенсибилизирующие или радиозащитные функции отдельных микроРНК, которые реагируют на

воздействие ИИ в острых, клинически значимых дозах [3]. Так, радиационно-индуцированные изменения уровня экспрессии некоторых микроРНК были продемонстрированы в различных типах клеток человека и модельных животных [4–8]. Позже было установлено, что микроРНК играют значительную роль в радиационном ответе клеток, регулируя соответствующие гены-мишени, участвующие в различных клеточных процессах, таких как репарация повреждений ДНК, контроль сверхточных точек клеточного цикла, апоптоз, аутофагия и окислительный стресс [9]. При этом обращает на себя внимание, что в мировой литературе нет данных по экспрессии микроРНК при хроническом низкоинтенсивном воздействии у человека.

Ранее нами было показано, что у хронически облученных жителей прибрежных сел р. Течи спустя 70 и более лет после начала радиационного воздействия, в период реализации канцерогенных эффектов, регистрировались изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов

периферической крови [10], а также изменения транскрипционной активности апоптотических генов, которые сопровождались снижением относительного содержания мРНК гена *BCL-2* и увеличением относительного содержания мРНК гена *BAH* [11].

Учитывая роль микроРНК в регуляции экспрессии генов, а также способность эпигенетических модификаций сохраняться достаточно длительное время после радиационного воздействия [12], целью настоящей работы было исследование профилей экспрессии зрелых микроРНК miR-29a, miR-30c, miR-150, генные мишени которых принимают непосредственное участие в реализации радиационно-индуцированных эффектов, в частности в регуляции клеточного цикла и апоптоза.

Настоящая работа является продолжением исследований экспрессии микроРНК у облученных на Южном Урале людей. В предыдущем исследовании [13] было установлено статистически значимое изменение экспрессии микроРНК miR-16, miR-181a и miR-125b в группе лиц с накопленной дозой облучения красного костного мозга (ККМ), превышающей 70 мГр.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Характеристика исследуемых групп

Исследование экспрессии зрелых микроРНК miR-29a, miR-30c, miR-150 в цельной крови проводилось у людей, проживавших в период с 1950 по 1960 г. в одном из 41 сел, расположенных на побережье р. Течи, и подвергавшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие плановых или аварийных сбросов радиоактивных отходов радиохимическим заводом ПО «Маяк» в реку [14]. Дозы облучения ККМ

были рассчитаны индивидуально с использованием дозиметрической системы Techa River Dosimetry System (TRDS 2016) [15].

Общее число обследованных для оценки экспрессии микроРНК составило 81 человек, которые позже были поделены на две группы (основная группа и группа сравнения). В основную группу вошли 56 человек. Группу сравнения составили 25 человек, проживающих в сходных социально-экономических условиях, значения накопленной дозы облучения ККМ которых не превышали 70 мГр (что соответствует фоновому уровню) [16]. Подробная характеристика обследуемых групп представлена в табл. 1.

Исследуемые группы сопоставимы по возрасту и этническому составу. Обе группы представлены преимущественно пожилыми людьми. В основной группе преобладали женщины, тогда как в группе сравнения мужчины и женщины были представлены примерно в равных долях. Поскольку современные данные демонстрируют возраст-зависимое изменение экспрессии некоторых микроРНК [17], связанное прежде всего с возникновением возраст-ассоциированных заболеваний [18], в настоящем исследовании группы обследованных лиц были выровнены по возрасту ( $p = 0,08$ ).

### Выделение РНК

Цельную кровь для оценки профилей экспрессии микроРНК забирали из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Thermo Scientific™, США). Экстракция суммарной РНК, среди которой находились зрелые микроРНК, осуществлялась с использованием коммерческого набора GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific™). Количественные и качественные характеристики выделенных образцов оценивали

**Таблица 1.** Характеристика исследуемых групп по оценке относительного содержания микроРНК

Характеристика групп		Основная группа <i>N</i> = 56	Группа сравнения <i>N</i> = 25
Возраст на момент обследования, лет: <i>M</i> ± SE (min–max)		72.68 ± 0.75 (63–85)	70.12 ± 1.33 (62–87)
Пол, <i>N</i> (%)	мужчины	22 (39.00%)	13 (52.00%)
	женщины	34 (61.00%)	12 (48.00%)
Национальность, <i>N</i> (%)	русские	26 (46.40%)	16 (64.00%)
	татары/башкиры	30 (53.60%)	9 (36.00%)
Накопленные дозы облучения ККМ, мГр: <i>M</i> ± SE (min–max)		652.74 ± 59.36 (86.72 – 1867.55)	29.10 ± 4.07 (2.13–67.98)
Накопленные дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр: <i>M</i> ± SE (min–max)		95.57 ± 11.85 (3.46–488.79)	11.02 ± 2.20 (0.18–33.33)

**Таблица 2.** Последовательности шпилькообразных праймеров исследуемых микроРНК

МикроРНК	Последовательности праймеров (5'→3')	Идентификатор в miRBase
miR-150-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACCACTGG	MIMAT0000451
miR-29a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACTAACCG	MIMAT0000086
miR-30c-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACGCTGAG	MIMAT0000244

**Таблица 3.** Последовательности праймеров и температурно-временной режим ПЦР в реальном времени для микроРНК

МикроРНК	Последовательности праймеров (5'→3')	Условия ПЦР-РВ
miR-150-5p	F: TATCCAGTGCAGGGTCCGA R: TCTCCCAACCCTTGATC P: FAM-CGCACTGGATACGACCACTGG-BHQ1	1. 95°C – 3 мин 2. 95°C – 15 с 3. 60°C – 1 мин* } 50 x
miR-29a-3p	F: TATCCAGTGCAGGGTCCGA R: TAGCACCATCTGAAATC P: FAM-TTCGCACTGGATACGACTAACCG-BHQ1	1. 95°C – 3 мин 2. 95°C – 15 с 3. 60°C – 1 мин* } 50 x
miR-30c-5p	F: TATCCAGTGCAGGGTCCGA R: TGTAACATCCTACACT P: FAM-TCGCACTGGATACGACGCTG-BHQ1	1. 95°C – 3 мин 2. 95°C – 15 сек 3. 60°C – 1 мин* } 50 x

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; P – зонд; \* – детекция сигнала флуоресценции.

спектрофотометрическим методом с использованием анализатора NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

#### Обратная транскрипция

Синтез кДНК на матрице РНК проводился отдельным этапом с использованием коммерческого набора реактивов MMLV RT Kit («Евроген», Россия) и специфических шпилькообразных праймеров (ООО «ДНК-СИНТЕЗ», Россия). Температурный режим синтеза кДНК исследуемых образцов микроРНК, проводимый на амплификаторе Veriti (Applied Biosystems, США), был следующим: 16°C/20 мин, 42°C/20 мин, 85°C/5 мин, лед/5 мин.

#### ПЦР-РВ

Относительную экспрессию зрелых микроРНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени

с использованием смеси 5X qPCRmix-NS (Евроген). Праймеры и зонды синтезированы ООО «ДНК-СИНТЕЗ». Для нормализации данных экспрессии микроРНК использовали среднее значение Ct малой ядрышковой РНК (мяРНК) RNU48 (U48). Данные полученной экспрессии анализировались с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [19].

Последовательности шпилькообразных праймеров, используемых для проведения обратной транскрипции (ОТ), представлены в табл. 2.

Температурный режим и последовательности праймеров микроРНК для ПЦР-РВ представлены в табл. 3.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных комплексов



Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США) и SigmaPlot (SYSTAT Software; США).

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение экспрессии микроРНК в исследуемых группах проводили с использованием  $U$ -критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ с целью поиска связи фактора радиационной (доза облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов) и нерадиационной (пол, национальность и возраст на момент исследования) природы с уровнем экспрессии зрелых микроРНК проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции по Спирмену ( $R_s$ ). Статистически значимыми считались вероятности ошибки менее 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Связь экспрессии микроРНК с некоторыми факторами нерадиационной природы*

Корреляционный анализ с целью оценки связи пола, возраста или национальности с показателями экспрессии микроРНК проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции по Спирмену ( $R_s$ ) (табл. 4).

Результаты проведенного анализа показали отсутствие связи между факторами нерадиационной природы (пол, национальность, возраст на момент исследования) и показателями экспрессии

микроРНК у облученных людей,  $p$ -значение во всех тестах превысило 5%.

### *Анализ данных экспрессии микроРНК в обследуемых группах*

Результаты анализа экспрессии микроРНК miR-150, miR-29a, miR-30c в исследуемых группах представлены в табл. 5.

При исследовании показателей относительной экспрессии микроРНК в основной группе было выявлено более низкое ( $p = 0,003$ ) относительное содержание микроРНК miR-30c, чем в группе сравнения. Полученные результаты также графически проиллюстрированы на рис. 1.

Таким образом, мы установили, что у лиц из основной группы относительно группы сравнения экспрессия микроРНК miR-30c статистически значимо снижена ( $p = 0,003$ ), при этом медианное значение экспрессии микроРНК в основной группе снижено более чем в 9 раз относительно группы сравнения.

Корреляционный анализ не выявил связи между накопленной дозой облучения тимуса и периферических лимфоидных органов и уровнем экспрессии исследуемых микроРНК. Однако была обнаружена слабая отрицательная связь между экспрессией микроРНК miR-30c и накопленной дозой облучения ККМ ( $R_s = -0,26$ ,  $p = 0,02$ ). Для других исследуемых микроРНК связь с накопленной дозой облучения ККМ не выявлена.

**Таблица 4.** Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена экспрессии микроРНК с факторами нерадиационной природы

Параметр	Пол	Возраст на момент обследования	Национальность
miR-29a	0.15 (0.21)	0.13 (0.27)	0.19 (0.10)
miR-30c	-0.09 (0.44)	-0.14 (0.23)	-0.06 (0,61)
miR-150	0.16 (0.16)	-0.07 (0.53)	-0.002 (0.99)

Примечание. В скобках указано  $p$ -значение, рассчитанное для коэффициентов ранговой корреляции Спирмена ( $R_s$ ).

**Таблица 5.** Относительное содержание (отн. ед.) микроРНК в группах обследованных лиц, Ме (Q1–Q3)

МикроРНК	Основная группа $N = 56$	Группа сравнения $N = 25$
miR-29a	0.95 (0.35–4.15) $p = 0.87$	1.70 (0.39–2.12)
miR-30c	0.18 (0.02–0.56) $p = 0.003$	1.75 (0.05–15.79)
miR-150	1.61 (0.20–3.43) $p = 0.48$	1.66 (0.40–3.99)

Примечание.  $p$  –  $p$ -значение для  $U$ -критерия в тесте Манна–Уитни.

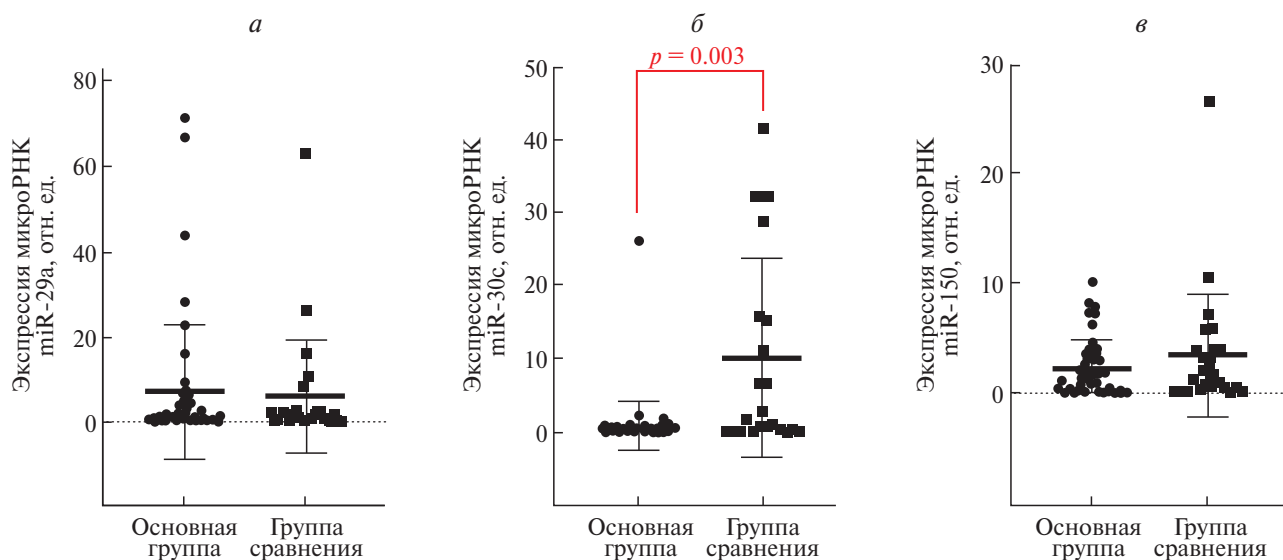


Рис. 1. Индивидуальные значения показателей относительного содержания микроРНК в исследуемых группах.

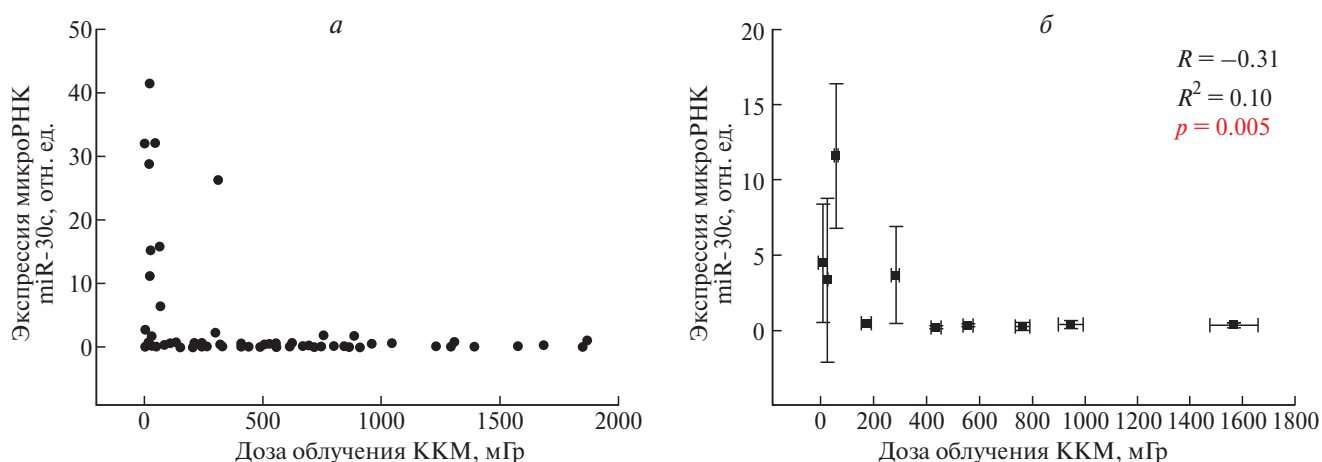


Рис. 2. Зависимость относительного содержания микроРНК miR-30c от накопленной дозы облучения ККМ, полученная в соответствии с данными индивидуальных показателей (а) и полученная путем аппроксимации данных (б, каждая точка является усредненным значением для восьми сгруппированных показателей).

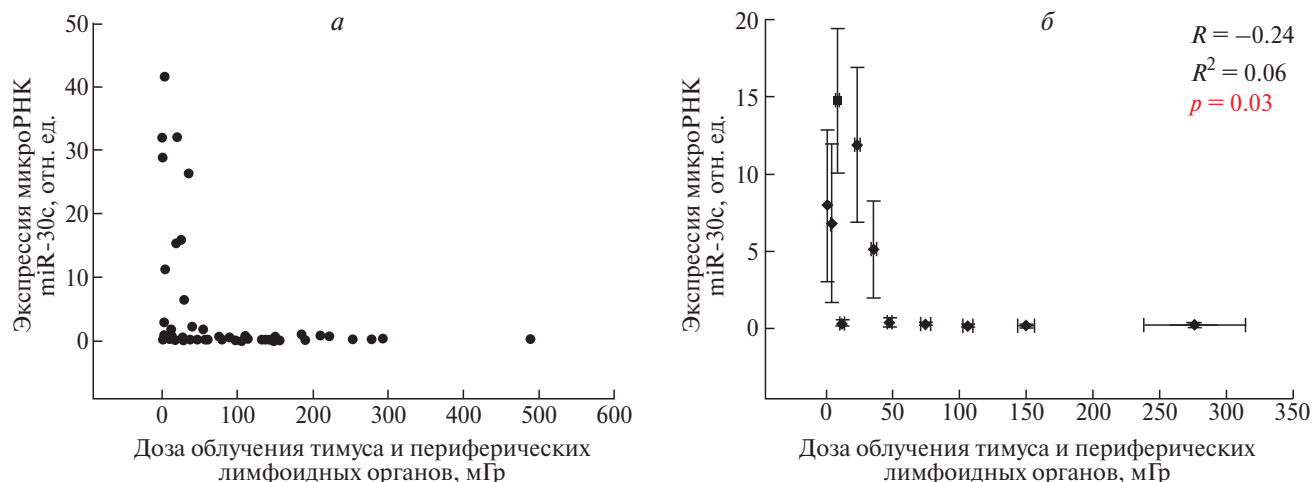
Зависимость экспрессии микроРНК от накопленной дозы облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов была оценена методом регрессионного анализа (рис. 2, 3).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии зависимости экспрессии микроРНК miR-30c от дозы облучения ККМ ( $R = -0,31$ ,  $R^2 = 0,10$ ,  $p = 0,005$ ), а также облучения тимуса и периферических лимфоидных органов ( $R = -0,24$ ,  $R^2 = 0,06$ ,  $p = 0,03$ ). Значения  $R^2$  в регрессионном анализе, не превышающие 10%, свидетельствуют об отсутствии линейной зависимости между исследуемыми показателями. Для остальных микроРНК зависимости экспрессии от накопленной дозы облучения ККМ,

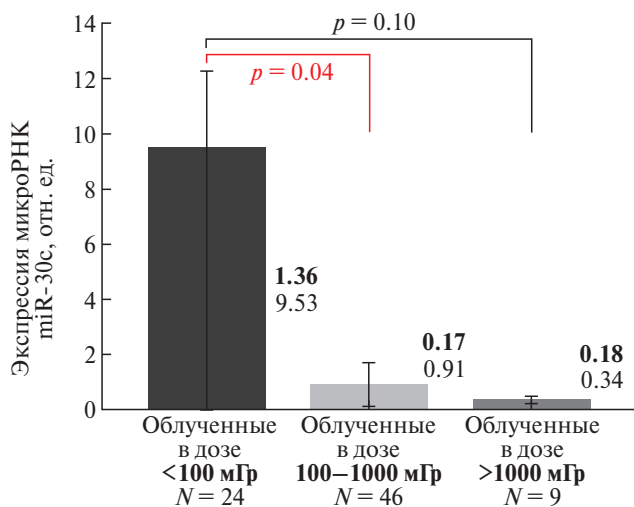
а также тимуса и периферических лимфоидных органов не обнаружено.

Поскольку нами была найдена связь между экспрессией микроРНК miR-30c и дозой облучения ККМ, а также зависимость ее экспрессии от дозы облучения ККМ, мы проанализировали экспрессию микроРНК miR-30c, объединив обследуемых людей, включая лиц из группы сравнения, в подгруппы, соответствующие различным диапазонам доз: 1) < 100 мГр; 2) 100–1000 мГр; 3) > 1000 мГр (рис. 4).

Обращает на себя внимание резкое снижение экспрессии данной микроРНК в группе облученных лиц с поглощенной дозой в ККМ более 100



**Рис. 3.** Зависимость относительного содержания микроРНК miR-30с от накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, полученная в соответствии с данными индивидуальных показателей (а) и полученная путем аппроксимации данных (б), каждая точка является усредненным значением для восьми сгруппированных показателей).



**Рис. 4.** Экспрессия микроРНК miR-30с в дозовых подгруппах: < 100 мГр, 100–1000 мГр и > 1000 мГр. Курсивом обозначены медианные (сверху) и средние (снизу) значения относительной экспрессии микроРНК в дозовых подгруппах.

мГр. Данная тенденция сохраняется также в дозовой подгруппе > 1000 мГр. Отсутствие статистически значимого различия между дозовыми подгруппами < 100 мГр и > 1000 мГр, вероятнее всего, обусловлено небольшим количеством лиц, входящих в дозовую подгруппу > 1000 мГр (9 человек).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Предполагается, что эффекты, индуцированные малыми дозами радиации, могут регулироваться

модуляцией некодирующих РНК, в частности микроРНК [20]. МикроРНК представляют собой важный механизм, с помощью которого клетки могут быстро изменять экспрессию генов, чтобы реагировать на генотоксический стресс, в том числе после радиационного воздействия. Нацеливаясь с частичной комплементарностью на 3'-нетранслируемую область (3'-UTR), 5'-UTR-область или на кодирующие области РНК в цитоплазме [21, 22], микроРНК способны подавлять трансляцию белка или при полной комплементарности приводить к деградации мРНК [23]. Таким образом, через регуляцию посттранскрипционной активности генов микроРНК способны влиять на сигнальные пути, которые могут изменять множество клеточных процессов, включая реакцию на ИИ.

Согласно данным литературы, экспрессия микроРНК miR-150, miR-29a характеризуется значительным снижением с увеличением дозы облучения [24], в то время как экспрессия микроРНК miR-30с, наоборот, характеризуется радиационно-индуцированным повышением ее экспрессии [25]. Важно подчеркнуть, что немногочисленные исследования, в которых наблюдалось повышение экспрессии miR-30с, проводились *in vitro* на культурах клеток в условиях острого облучения в высоких дозах [26–28]. Метаанализ [29], обобщающий результаты девяти исследований экспрессии микроРНК miR-30с в клетках мышей, приматов и человека в условиях острого однократного и фракционированного облучения в высоких дозах показал, что уровни экспрессии микроРНК miR-30с положительно коррелировали с дозой облучения ( $FC = 1,19$ ; 95% ДИ 1.09–1.30;  $b_1$  [total dose] = 0,01;  $p = 0,0134$ ).

В настоящем исследовании в отдаленном периоде у лиц, подвергшихся хроническому облучению, мы не наблюдали изменений в экспрессии микроРНК miR-150, miR-29a, при этом экспрессия микроРНК miR-30c снижалась в клетках периферической крови. Вероятно, наблюдаемое снижение экспрессии данной микроРНК обусловлено особенностями радиационного воздействия, которому подверглись жители Уральского региона. Жители населенных пунктов, расположенных вдоль р. Течи, подвергались *in vivo* многолетнему низкоинтенсивному облучению из-за повышенного гамма-радиационного фона вблизи реки, а также от смеси радионуклидов, поступающих в организм с водой и пищевыми продуктами. Также стоит обратить внимание на то, что данное исследование экспрессии микроРНК проводилось не сразу после облучения, а спустя многие годы после прекращения радиационного воздействия.

Выбранные для настоящего исследования микроРНК могут являться регуляторами клеточного ответа при радиационном воздействии. В частности, сообщалось, что микроРНК семейства miR-30 вовлечены в клеточный ответ на радиационное воздействие [28], в большей степени из-за их роли в контроле развития клеточного цикла, а miR-30c играет ключевую роль в радиационно-индуцированном апоптозе [30, 31].

Алгоритм TargetScanHuman ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) прогнозирует более 1500 генов, имеющих потенциальные сайты связывания в 3'-UTR-области с микроРНК miR-30c, среди которых обнаруживаются гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз, такие как *MAPK8* и *BCL-2*. Уже сегодня результаты некоторых экспериментальных исследований подтверждают связь микроРНК miR-30c с геном *BCL-2* [32, 33], являющимся центральной фигурой множества регуляторных систем клетки, таких как апоптоз, пролиферация и поддержание генетической стабильности.

Помимо факторов радиационной природы, согласно литературным данным, на уровень экспрессии микроРНК также могут оказывать влияние различные факторы нерадиационной природы; в частности, известно о возраст-зависимом снижении экспрессии некоторых микроРНК [17], при этом измененная экспрессия микроРНК потенциально может быть диагностическим индикатором возрастных заболеваний [18]. Помимо этого, в некоторых исследованиях сообщалось о дифференциальной экспрессии микроРНК у мужчин и женщин [33]. Однако проведенный нами анализ по поиску связи экспрессии микроРНК с некоторыми факторами нерадиационной природы, такими как пол, национальность и возраст, на момент исследования не выявил связи с данными показателями в обследуемой группе людей. Стоит подчеркнуть, что отсутствие корреляции между возрастом

обследуемых людей и экспрессией микроРНК могло быть обусловлено тем, что в исследование были включены преимущественно пожилые люди, возрастной диапазон которых составил от 62 до 87 лет.

В результате проведенного исследования у людей, подвергшихся низкоинтенсивному хроническому радиационному воздействию с накопленными дозами облучения ККМ в диапазоне от 86,72 до 1867,55 мГр наблюдалось снижение в периферической крови экспрессии зрелой микроРНК miR-30c, при этом была установлена слабая отрицательная корреляционная связь между экспрессией микроРНК miR-30c и накопленной дозой облучения ККМ, а также нелинейная зависимость ее экспрессии от накопленной дозы облучения ККМ, а также облучения тимуса и периферических лимфоидных органов. Статистически значимые различия в относительном содержании данной микроРНК также наблюдались между дозовыми подгруппами. В то же время экспрессия данной микроРНК не продемонстрировала связи с факторами нерадиационной природы, такими как пол, возраст или национальность.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют об изменении экспрессии микроРНК в периферической крови у людей, проживавших на радиоактивно загрязненных территориях, на основании чего можно предположить возможное участие микроРНК в модуляции процессов, направленных на поддержание генетического гомеостаза в период реализации отдаленных канцерогенных и нераковых эффектов у жителей Уральского региона, однако для уточнения и подтверждения результатов, полученных в настоящей работе, необходимо увеличение объема выборки исследуемых лиц.

Финансирование работы осуществлялось в рамках Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года».

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России 08.04.2024, №7.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liang L. H., He X. H.* Macro-management of microRNAs in cell cycle progression of tumor cells and its implications in anti-cancer therapy // *Acta Pharmacol. Sin.* 2011. V. 32. № 11. P. 1311–1320. DOI: 10.1038/aps.2011.103
2. *Chaudhry M. A., Omaruddin R. A., Kreger B. et al.* MicroRNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation// *Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 39. № 7. P. 7549–7558. DOI: 10.1007/s11033-012-1589-9
3. *Metheetraitut C., Slack F. J.* MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy// *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. № 1. P. 12–19. DOI: 10.1016/j.gde.2013.01.002
4. *Weidhaas J. B., Babar I., Nallur S. M. et al.* MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy// *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 23. P. 11111–11116. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2858
5. *Kato M., Paranjape T., Müller R. U. et al.* The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in *C. elegans* and *in vitro* in human breast cancer cells// *Oncogene.* 2009. V. 28. № 25. P. 2419–2424. DOI: 10.1038/onc.2009.106
6. *Ilyitskiy Y., Koturbash I., Kovalchuk O.* Radiation-induced bystander effects *in vivo* are epigenetically regulated in a tissue-specific manner// *Environ. Mol. Mutagen.* 2009. V. 50. P. 105–113. <https://doi.org/10.1002/em.20440>
7. *Port M., Herodin F., Valente M., et al.* MicroRNA expression for early prediction of late occurring hematologic acute radiation syndrome in baboons // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0165307
8. *Chiba M., Monzen S., Iwaya C. et al.* Serum miR-375-3p increase in mice exposed to a high dose of ionizing radiation// *Scientific Reports.* 2018. V. 8. № 1. P. 1302. DOI: 10.1038/s41598-018-19763-7
9. *Gandellini P., Rancati T., Valdagni R., Zaffaroni N.* MiRNAs in tumor radiation response: bystanders or participants? // *Trends Mol. Med.* 2014. V. 20. № 9. P. 529–539. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.07.004
10. *Блинова Е. А., Котикова А. И., Янишевская М. А., Аклеев А. В.* Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию// *Мед. радиология и радиационная безопасность.* 2020. Т. 65. № 4. С. 36–42. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42
11. *Никифоров В. С., Блинова Е. А., Котикова А. И., Аклеев А. В.* Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (*TP53, MDM2, ATM, BAX, BCL-2, CDKN1A, OGG1, XPC, PADI4, MAPK8, NF-KB1, STAT3, GATA3*) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови // *Вавил. Жур. генетики и селекции.* 2022. Т. 26. № 1. С. 50–58. DOI: 10.18699/VJGB-22-08. – EDN KBBUEC
12. *Burgio E., Piscitelli P., Migliore L.* Ionizing radiation and human health: Reviewing models of exposure and mechanisms of cellular damage. An Epigenetic perspective // *Int. J. Environ Res. Public Health.* 2018. V. 15. № 9. P. 1971. DOI: 10.3390/ijerph15091971
13. *Янишевская М. А., Блинова Е. А., Аклеев А. В.* Влияние хронического радиационного воздействия на экспрессию микроРНК человека // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 10. С. 1171–1178.
14. *Силкин С. С., Крестинина Л. Ю., Старцев В. Н. и др.* Уральская когорта аварийно-облученного населения // *Медицина экстремальных ситуаций.* 2019. Т. 21. № 3. С. 393–402.
15. *Degteva M. O., Napier B. A., Tolstykh E. I. et al.* Enhancements in the Techa river dosimetry system: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures // *Health Physics.* 2019. V. 117. № 4. P. 378–387. DOI: <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001067>
16. СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 100 с. <https://docs.cntd.ru/document/902170553> (дата обращения: 17.10.2023).
17. *Noren Hooten N., Fitzpatrick M., Wood W. H. et al.* Age-related changes in microRNA levels in serum // *Aging (Albany NY).* 2013. V. 5. № 10. P. 725–740. DOI: 10.18632/aging.100603
18. *Noren Hooten N., Abdelmohsen K., Gorospe M. et al.* MicroRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0010724
19. *Livak K. J., Schmittgen T. D.* Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) Method//*Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
20. *Chaudhry M. A., Omaruddin R. A., Kreger B. et al.* MicroRNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation // *Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 39. № 7. P. 7549–7558. DOI: 10.1007/s11033-012-1589-9
21. *Lee I., Ajay S. S., Jong I. Y. et al.* New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR- and 3'-UTR-interaction sites // *Genome Research.* 2009. V. 19. № 7. P. 1175–1183. DOI: 10.1101/gr.089367.108
22. *Brummer A., Hausser J.* MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation //

- BioEssays. 2014. V. 36. № 6. P. 617–626.  
DOI: 10.1002/bies.201300104
23. *Valinezhad Orang A., Safaralizadeh R., Kazemzadeh-Bavili M.* Mechanisms of miRNA-Mediated gene regulation from common downregulation to miRNA-specific upregulation // *Int. J. Genomics*. 2014. V. 2014.  
DOI: doi 10.1155/2014/970607
24. *Dinh T.-K. T., Fendler W., Chałubińska-Fendler J. et al.* Circulating miR-29a and miR-150 correlate with delivered dose during thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer // *Rad. Oncology*. 2016. V. 11. P. 61.  
DOI: 10.1186/s13014-016-0636-4
25. *Li X. H., Ha C. T., Fu D., Xiao M.* Micro-RNA30c negatively regulates REDD1 expression in human hematopoietic and osteoblast cells after gamma-irradiation // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0048700
26. *Acharya S. S., Fendler W., Watson J. et al.* Serum microRNAs are early indicators of survival after radiation-induced hematopoietic injury // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. № 287.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa6593
27. *Li X. H., Ha C. T., Fu D.* Delta-tocotrienol suppresses radiation-induced microRNA-30 and protects mice and human CD34+ cells from radiation injury // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0122258
28. *Li X. H., Ha C. T., Xiao M.* MicroRNA-30 inhibits antiapoptotic factor Mcl-1 in mouse and human hematopoietic cells after radiation exposure // *Apoptosis*. 2016. V. 21. № 6. P. 708–720.  
DOI: 10.1007/s10495-016-1238-1
29. *Malachowska B., Tomasik B., Stawiski K. et al.* Circulating microRNAs as biomarkers of radiation exposure: A systematic review and meta-analysis // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2020. V. 106. № 2. P. 390–402.  
DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.10.028
30. *Guo Y., Sun W., Gong T. et al.* MiR-30a radiosensitizes non-small cell lung cancer by targeting ATF1 that is involved in the phosphorylation of ATM // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 4. P. 1980–1988.  
DOI: 10.3892/or.2017.5448
31. *Yuan L. Q., Zhang T., Xu L. et al.* MiR-30c-5p inhibits glioma proliferation and invasion via targeting Bcl2 // *Transl. Cancer Res.* 2021. V. 10. № 1. P. 337–348.  
doi 10.21037/tcr-19-2957
32. *Ostadrähimi S., Fayaz S., Parvizhamidi M. et al.* Downregulation of miR-1266-5P, miR-185-5P and miR-30c-2 in prostatic cancer tissue and cell lines // *Oncol Lett.* 2018. V. 15. № 5. P. 8157–8164.  
DOI: 10.3892/ol.2018.8336
33. *Sharma S., Eghbali M.* Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease // *Biol Sex Differ.* 2014. V. 5. № 1. P. 3.  
DOI: 10.1186/2042-6410-5-3

## Expression of miR-29a, miR-30c AND miR-150 microRNAs in the Long-Term Period after Chronic Radiation Exposure

M. A. Yanishevskaya<sup>1, \*</sup>, E. A. Blinova<sup>1, 2</sup>, A. V. Akleyev<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>*Ural Research Center for Radiation Medicine, FMBA of Russia, Chelyabinsk, 454141 Russia*

<sup>2</sup>*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, 454001 Russia*

*\*e-mail: yanishevskaya@urcrm.ru*

Every year, more and more data demonstrate that microRNA expression levels were significantly altered after acute radiation exposure, and microRNAs themselves play an important role in the cellular response to ionizing radiation. However, regulation of microRNA expression after chronic radiation exposure within the low and middle dose range is poorly understood. In the present study, the expression of mature miR-29a, miR-30c, and miR-150 microRNAs in whole blood from 81 individuals in the long-term period after chronic low dose-rate radiation exposure was analyzed by real-time PCR method. The mean age of the studies people was 72 years, and the accumulated radiation doses to red bone marrow (RBM), thymus and peripheral lymphoid organs ranged from 2.13 to 1867.55 mGy and 0.18 to 488.79 mGy, respectively. More than 70 years after the onset of radiation exposure, a statistically significant dose-dependent decrease in miR-30c microRNA expression was found in exposed individuals in RBM, thymus and peripheral lymphoid organs.

**Keywords:** microRNA, expression, PCR-RT, Techa River, chronic low dose-rate exposure, radiation exposure.

+УДК 575.117.2:612.112+616.24:616-071

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *LYST* И *SLFN12L* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ С ХРОНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2024 г. И. Е. Малышева<sup>1,\*</sup>, О. В. Балан<sup>1</sup>, Э. Л. Тихонович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, 185910 Россия

<sup>2</sup>Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, 185019 Россия

\*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 14.06.2024 г.

В настоящей работе изучена экспрессия генов *LYST* и *SLFN12L* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) у больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания и у здоровых людей (контроль). В исследовании приняли участие 45 человек — 20 больных (без терапии, с хроническим течением саркоидоза легких (II стадия заболевания), средний возраст больных  $41,00 \pm 12,56$  года) и 25 здоровых людей (средний возраст  $45,86 \pm 2,13$  года). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Установлено достоверное снижение количества транскриптов гена *SLFN12L* ( $p = 0,002$ ) и уменьшение содержания мРНК гена *LYST* ( $p = 0,09$ ) в ЛПК больных саркоидозом легких по сравнению с контролем. Дифференциальная экспрессия *LYST* и *SLFN12L* может свидетельствовать о вовлечении указанных генов в патогенез данного заболевания, а также о возможном участии в модулировании иммунных реакций при развитии воспалительных процессов при саркоидозе легких.

**Ключевые слова:** *Homo sapiens*, саркоидоз легких, лейкоциты периферической крови, ПЦР в режиме реального времени, *LYST*, *SLFN12L*, экспрессия генов.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110096 **EDN:** WBCMAC

Саркоидоз легких (болезнь Бенье—Бека—Шауманна) относится к системным воспалительным заболеваниям неизвестной этиологии. В большинстве случаев (до 90%) эпителиоидно-клеточные гранулемы (характерный признак заболевания) образуются в легких. В дальнейшем они могут рассасываться или претерпевать фиброзные изменения, что может способствовать развитию дыхательной недостаточности [1, 2]. Разнообразие клинических проявлений и вариантов течения заболевания, а также отсутствие конкретного диагностического критерия сопряжено с определенными трудностями диагностики саркоидоза легких [3]. В связи с этим актуальным является поиск молекулярно-генетических маркеров для ранней диагностики и разных вариантов течения заболевания. В развитии данного заболевания важную роль играют средовые, иммунологические, генетические факторы [4]. Генетическая составляющая в патогенезе саркоидоза легких имеет немаловажное значение, о чем свидетельствует более частое возникновение заболевания в определенных расовых и этнических группах, а также более высокая

распространенность саркоидоза среди родственников первой степени родства [5, 6].

В последние годы проведены комплексные исследования по анализу данных секвенирования метилома, транскриптома, микроРНК у больных саркоидозом. В результате было выявлено множество новых генетических локусов и генов предрасположенности к саркоидозу, что указывает на сложные генетические и патофизиологические механизмы развития этого заболевания [7]. I. Konigsberg с соавт. [8], анализируя метилом и транскриптом (в частности микроРНК в клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) больных саркоидозом), установили молекулярные изменения, связанные с развитием и прогрессированием заболевания. Выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены, такие как *LYST*, *SLFN12L* и др. [8]. Согласно данным литературы, ген *LYST* (также известный как *CHSI*) кодирует белок-регулятор лизосомального гомеостаза, участвующий в транспорте везикул, слиянии их с лизосомами и высвобождении лизосомальных ферментов, а также в сохранении количества



Таблица 1. Последовательность праймеров для ПЦР-РВ

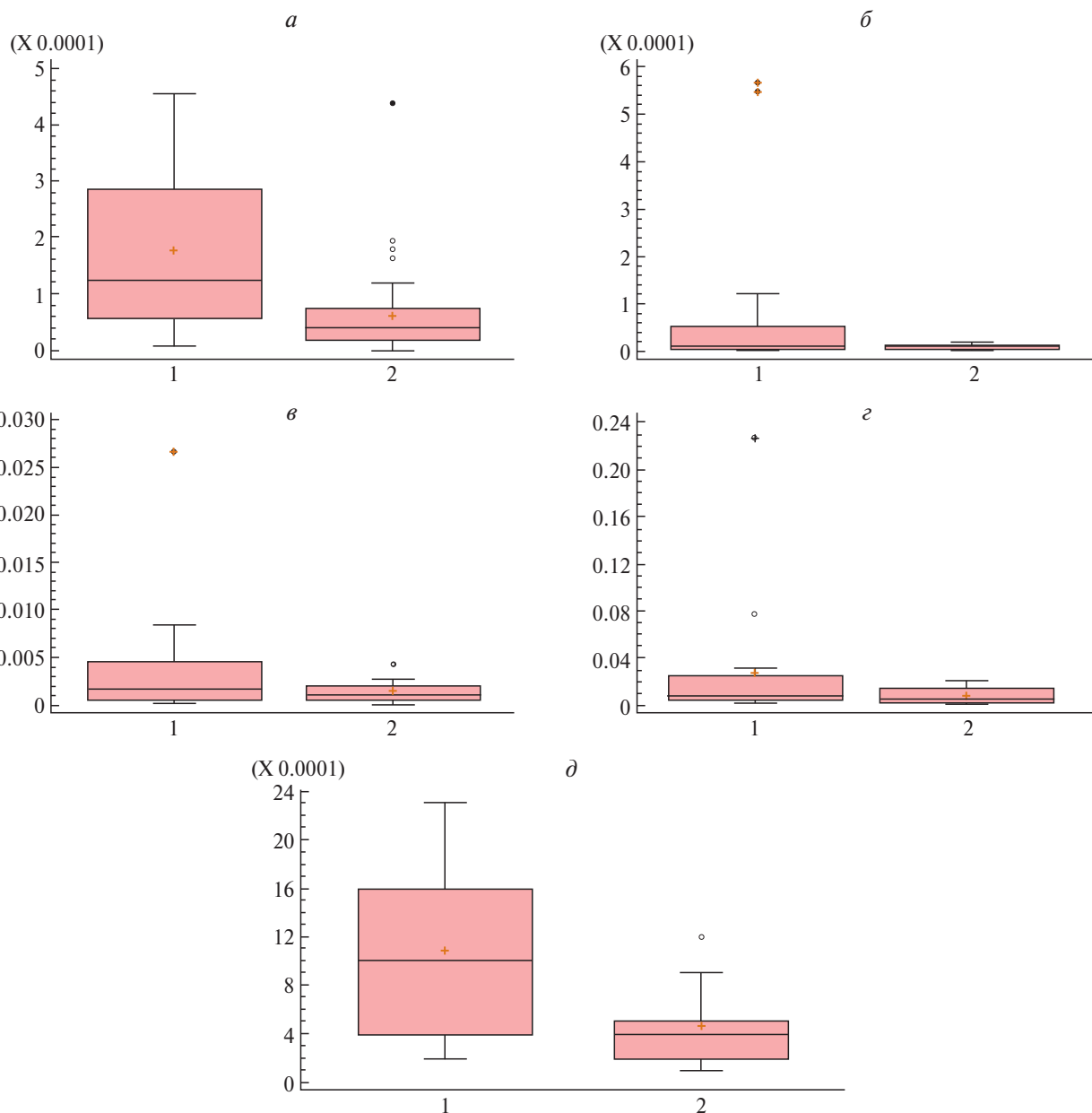
Ген (№ в NCBI)	Праймер	Последовательность праймера 5'–3'	Источник
<i>18sRNA</i> (NR_145819.1)	Прямой	agaaacggctaccacatcca	[15]
	Обратный	caccagacttgccctcca	
<i>RPL19</i> (NM_000981.4)	Прямой	aatgccaatgccaaactc	Собственный дизайн
	Обратный	cctccgcttacctatgc	
<i>LYST</i> (NM_000081.4)	Прямой	caaagggagtctgggatttc	Собственный дизайн
	Обратный	caatagtctgtggcttcgc	
<i>SLFN12L</i> (NM_001363830.2)	Прямой	tctccagatcaccaggcca	Собственный дизайн
	Обратный	tgctcctcgcttcatctcc	
<i>LC3B2</i> (NM_001085481.3)	Прямой	cggtgataatagaacgatacaagg	Собственный дизайн
	Обратный	ctgagattgggtgagagacg	
<i>p53</i> (NM_000546.6)	Прямой	cgtcagaagcaccaggact	[16]
	Обратный	catcctctccccacaaca	
<i>ATG5</i> (NM_004849.4)	Прямой	ttcctggagtctctgctacc	Собственный дизайн
	Обратный	atctttgtcatctgtcattctcc	

лизосом после аутофагии [9, 10]. В результате мутаций в гене *LYST* нарушается формирование внутриклеточных гранул в различных клетках. Так, при синдроме Чедиака–Хигаши (редкое иммунодефицитное аутосомно-рецессивное заболевание), дефектный лизосомальный транспорт в нейтрофилах приводит к образованию в клетках гигантских гранул. При этом происходит снижение хемотаксических реакций и способность этих клеток к внутриклеточному уничтожению бактерий [11]. Наряду с *LC3B2* и *ATG5* ген *LYST* может рассматриваться как маркер аутофагии. Важную роль в процессах апоптоза, а также в дифференцировке иммунных клеток и иммунной регуляции играют белки, кодируемые генами семейства *Schlafen* (*SLFN*) [12]. Так, повышение содержания *SLFN12* блокирует процессы трансляции и активирует апоптоз. Высокая экспрессия этого гена отмечена в моноцитах, а *SLFN5* – в Т-лимфоцитах первичных культур клеток человека [13]. В клетках БАЛ у больных саркоидозом регистрируется дифференциальная экспрессия гена *SLFN12L* [8]. Сведения о том, как изменяется уровень экспрессии указанных генов в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) больных при развитии саркоидоза легких II стадии (которая наиболее часто рентгенологически диагностируется у большей части больных [14]), могут иметь важное значение для изучения патогенетических механизмов развития и прогрессирования саркоидоза легких.

В настоящем исследовании проведена оценка уровня экспрессии генов *LYST*, *SLFN12L* в ЛПК у

больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания (II стадия заболевания), без терапии, а также у здоровых людей (контроль). Было обследовано 45 человек – 20 больных (без терапии, с хроническим течением саркоидоза легких (II стадия заболевания), средний возраст больных  $41,00 \pm 12,56$  года) и 25 здоровых людей (средний возраст  $45,86 \pm 2,13$  года). Диагноз «саркоидоз легких» установлен в соответствии с критериями на основе клинико-рентгенологических и лабораторных изменений. Саркоидоз у всех пациентов (100%) был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. Больные саркоидозом легких со стабильным течением при отсутствии активности данного заболевания находились без терапии и не получали других видов лечения на момент проведения исследования.

Длительность наблюдения больных саркоидозом легких – от 1 года до 12 лет. До проведения исследований было получено информированное письменное согласие от всех пациентов. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела  $\geq 30$  кг/м. Работа была выполнена с соблюдением этических норм согласно критериям Всемирной ассоциации медицинских редакторов (The World Association of Medical Editors – WAME) и одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская



**Рис. 1.** Уровень экспрессии генов *SLFN12L* (а), *LYST* (б), *LC3B2* (в), *p53* (г) и *ATG5* (д) в ЛПК условно здоровых доноров (1) и пациентов с саркоидозом легких (2). Горизонтальные линии внутри прямоугольников – медиана, • – среднее значение.

больница им. В.А. Баранова» г. Петрозаводска, протокол № 165 от 02.11.2023 г. Образцы венозной крови использовали в качестве материала для исследования. Пробы периферической крови в исследуемых группах людей были взяты в утренние часы (8.00), натощак.

Из лейкоцитов периферической крови выделяли тотальную РНК, используя реагент для выделения РНК PureZol (Bio-Rad). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия). Уровень экспрессии генов *LYST*,

*SLFN12L*, а также *LC3B2*, *p53* и *ATG5* в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). В качестве референсных генов были выбраны *18sRNA* и *RPL19*. ПЦР-РВ для каждого образца проводили не менее трех раз. Конструирование праймеров осуществляли в программе Beacon Designer 5.0. Нуклеотидная последовательность праймеров представлена в табл. 1.

Статистическая обработка данных проведена в программе StatGraphics Centurion XVI (версия 16.1.11). Достоверность различий уровня транскриптов гена между группами оценивали с помощью непараметрического критерия *U* Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП ФИЦ КАРНЦ РАН.

Результаты исследований представлены на рис. 1. На фоне хронического течения саркоидоза легких в ЛПК пациентов, не находящихся на противовоспалительной терапии, отмечается статистически значимое снижение уровня экспрессии *SLFN12L*, сопровождающееся уменьшением уровня мРНК гена *p53*. Экспрессия генов *LYST* и *LC3B2* (маркера уровня аутофагии) также была снижена и сопровождалась статистически значимым уменьшением уровня мРНК гена *ATG5*. Кроме того, положительная тесная связь выявлена между экспрессией *LYST* и *ATG5*, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,56 ( $p = 0,0001$ ).

Повышенный уровень экспрессии исследуемых генов в ЛПК больных саркоидозом легких, вероятно, свидетельствует об их вовлечении в патогенез данного заболевания. Возможно, кодируемые генами *LYST* и *SLFN12L* белковые продукты вовлечены в модулирование иммунных процессов, которые, в свою очередь, могут вносить определенный вклад в развитие воспаления [17] и фибропролиферативные нарушения при саркоидозе легких посредством снижения активности аутофагии. Наблюдаемые изменения уровня экспрессии исследуемых генов в ЛПК больных саркоидозом легких с хроническим развитием заболевания II стадии можно использовать для изучения патогенетических механизмов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра Российской академии наук (тема FMEN-2022-0017 12203100099-1).

Исследование одобрено Этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» г. Петрозаводска, протокол № 165 от 02.11.2023 г.

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

От каждого из включенных в исследование участников или их законных представителей было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саркоидоз / под ред. А. А. Визеля. М.: Атмосфера, 2010. 30 с.
2. *Baughman R. P., Culver D. A., Judson M. A.* A concise review of pulmonary sarcoidosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 183. № 5. P. 573–581. DOI: 10.1164/rccm.201006-0865CI
3. *Lynch J. P., Ma Y. L., Koss M. N., White E. S.* Pulmonary sarcoidosis // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007. V. 28. № 31. P. 53–74. DOI: 10.1055/s-2007-970333
4. *Patterson K. C., Chen E. S.* The pathogenesis of pulmonary sarcoidosis and implications for treatment // *CHEST.* 2018. V. 153. № 6. P. 1432–1442. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00778.x
5. *McDougal K., Fallin M., Moller D. et al.* Variation in the lymphotoxin-alpha/tumor necrosis factor locus modifies risk of erythema nodosum in sarcoidosis // *J. Invest. Dermatol.* 2009. V. 129. № 8. P. 1921–1926. DOI: 10.1038/jid.2008.456
6. *Terwiel M., van Moorsel C. H. M.* Clinical epidemiology of familial sarcoidosis: A systematic literature review // *Respir. Med.* 2019. V. 149. P. 36–41.
7. *Hoc̆evar K., Maver A., Kunej T., Peterlin B.* Sarcoidosis related novel candidate genes identified by multi-omics integrative analyses // *OMICS.* 2018. V. 22. № 5. P. 322–331. DOI: 10.1089/omi.2018.0027
8. *Konigsberg I. R., Lin N. W., Liao S. Y. et al.* Multi-omic signatures of sarcoidosis and progression in bronchoalveolar lavage cells // *bioRxiv.* 2023. DOI: 10.1101/2023.01.26.525601
9. *Ji X., Chang B., Naggert J. K., Nishida P. M.* Lysosomal trafficking regulator // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 854. P. 745–750. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0\_99
10. *Lattao R., Rangone H., Llamazares S. et al.* Mauve/LYST limits fusion of lysosome-related and promotes centrosomal recruitment of microtubule nucleating proteins // *Dev. Cell.* 2021. V. 56. № 7. P. 1000–1013. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.02.019
11. *Silva L. M., Brenchley L., Moutsopoulos N. M.* Primary immunodeficiencies reveal the essential role of tissue neutrophils in periodontitis // *Immunol. Rev.* 2019. V. 287. № 1. P. 226–235. DOI: 10.1111/imr.12724
12. *Jo U., Pommier Y. S.* Structural, molecular, and functional insights into Schlafen proteins // *Exp. Mol. Med.* 2022. V. 54. № 6. P. 730–738. DOI: 10.1038/s12276-022-00794-0
13. *Puck A., Aigner R., Modak M. et al.* Expression and regulation of Schlafen (SLFN) family members in primary human monocytes, monocyte-derived dendritic cells and T-cells // *Res. Immunol.* 2015. V. 5. P. 23–32.

14. Criado E., Sánchez M., Ramírez J., et al. Pulmonary sarcoidosis: Typical and atypical manifestations at high-resolution CT with pathologic correlation // *RadioGraphics*. 2010. V. 30(6). P. 1567–1586. DOI: 10.1148/rg.306105512
15. Pinto J., Dias V., Zoller H. et al. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes // *Immunology*. 2010. V. 130 № 2. P. 217–230. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x
16. Zhang F., Sriram S. Identification and characterization of the interferon- $\beta$ -mediated p53 signal pathway in human peripheral blood mononuclear cells // *Immunology*. 2009. V. 128. Pt. 2. P. e905–e918. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03104.x
17. Pang Y., Wu L., Tang C. et al. Autophagy-inflammation interplay during infection: Balancing pathogen clearance and host onflammation // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. DOI: 10.3389/fphar.2022.832750

## Expression of the *LYST* and *SLFN12L* Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Patients with Chronic Pulmonary Sarcoidosis

I. E. Malysheva<sup>1, \*</sup>, O. V. Balan<sup>1</sup>, E. L. Tikhonovich<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia

<sup>2</sup>Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, 185019 Russia

\*e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

The expression of the *LYST* and *SLFN12L* genes in peripheral blood leukocytes (PBL) in patients with pulmonary sarcoidosis with a chronic course of the disease and in healthy people was studied in this work. Patients with chronic pulmonary sarcoidosis, on the second stage of the disease (20 people without therapy, average age of whom was  $41.00 \pm 12.56$  years) and 25 healthy people (average age was  $45.86 \pm 2.13$  years) were enrolled in this study. The level of gene expression was determined by real-time PCR. A significant decrease in the transcripts of the *SLFN12L* gene ( $p = 0.002$ ) and a low content of mRNA of the *LYST* gene ( $p = 0.09$ ) in the PBL of patients with pulmonary sarcoidosis compared to healthy people was established. Differential expression of *LYST* and *SLFN12L* may indicate the involvement of these genes in the pathogenesis of this disease, and it is possible they participate in the modulation of immune reactions during the development of inflammatory processes in pulmonary sarcoidosis.

**Keywords:** *Homo sapiens*, pulmonary sarcoidosis, peripheral blood leukocytes, real-time PCR, *LYST*, *SLFN12L*, gene expression.



## ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОКРАСА МЕХА СОБОЛЯ (*Martes zibellina* L.), ПОИСК МУТАЦИЙ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ОТСУТСТВИЕ ПИГМЕНТАЦИИ (АЛЬБИНОС)<sup>1</sup>

© 2024 г. П. А. Филимонов<sup>1</sup>, А. Д. Манахов<sup>1, 2, 3</sup>, М. И. Митина<sup>2</sup>, А. А. Онохов<sup>1</sup>,  
И. Е. Чернова<sup>4</sup>, Л. В. Максимова<sup>4</sup>, С. Н. Каштанов<sup>1, \*</sup>, Е. И. Рогаев<sup>2, 3, 5</sup>

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

<sup>2</sup>Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», пгт. Сириус, 354340 Россия

<sup>3</sup>Центр генетики и генетических технологий, Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>4</sup>АО «Русский соболь» Московская область, пос. Зверосовхоз, 141214 Россия

<sup>5</sup>Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии,  
Шрусбери, 01545 США

\*e-mail: snkashtanov@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2024 г.

После доработки 10.06.2024 г.

Принята к публикации 25.06.2024 г.

В одоместичированной популяции соболя, спустя почти 100 лет отбора, были зафиксированы первые особи с цветной окраской меха. Так, в потомстве пары соболей черной окраски меха родился щенок окраски пастель. По результатам исследования была выявлена однонуклеотидная инсерция в гене *TYRP1*, определяющая этот окрас меха соболя, тип наследования рецессивный. В 2022 г. в этой популяции у представителей двух линий соболей родились одновременно щенки с белой окраской меха. У большинства видов млекопитающих альбинизм обусловлен мутациями в гене *TYR*, кодирует фермент тирозиназу. В настоящем исследовании ген соболя *TYR* был исследован как функциональный ген-кандидат на альбинизм. Анализ нуклеотидных последовательностей кодирующей области гена *TYR* и сайтов сплайсинга не выявил у соболей белой окраски отличий от соболей стандартной окраски, что позволяет предположить, что исследуемый фенотип обусловлен генетическими вариантами в других генах.

**Ключевые слова:** *Martes zibellina*, соболь, тирозиназа, ген-кандидат, ген *TYR*, сайт сплайсинга.

**DOI:** 10.31857/S0016675824110107 **EDN:** WAXTHA

Создание ферм по разведению соболя в начале XX в. связано с промысловым уничтожением ряда природных популяций, снижением численности вида в целом и последующей фрагментацией ареала [1, 2]. Генофонд первой в России фермерской популяции соболя формировался с 1929 г. в Подмосковье, ферма «Пушкинский». Для этих целей из природных популяций Сибири и Дальнего Востока было изъято более 1000 соболей [3]. Необходимо отметить, что вид представлен несколькими географическими типами, различающимися по ряду количественных признаков и окраске меха. Так, популяции на краях ареала светлых тонов от песочно-желтой до коричневой, в центре более темной, иногда черной окраски. Эти различия приобретены в процессе освоения новых территорий. Основанная на данных фенотипических различиях

особей из популяций географических регионов таксономическая структура вида представлена в ряде публикаций [4–7]. Всего при формировании первой фермерской популяции соболя было привлечено более десяти природных популяций, следовательно, можно предположить, что большая часть генетического разнообразия вида была задействована на первом этапе одоместикации. Дифференциация географических популяций соболя, проведенная по данным количественных признаков, подтверждается исследованиями с применением генетических маркеров [8, 9].

Анализ племенных документов начального периода одоместикации показал, что значительная часть соболей природных популяций смогла адаптироваться к фермерскому содержанию и впоследствии к направленному отбору по количественным признакам [10, 11]. Среди соболей природных популяций, поступивших на ферму для разведения, не выявлено животных с окрасом

<sup>1</sup>Дополнительные материалы размещены в электронном виде по doi статьи.



**Рис. 1.** Щенок соболя окраски альбинос (номер в коллекции 9706), родился в зверохозяйстве «Пушкинский» от пары соболей окраски «пастель».

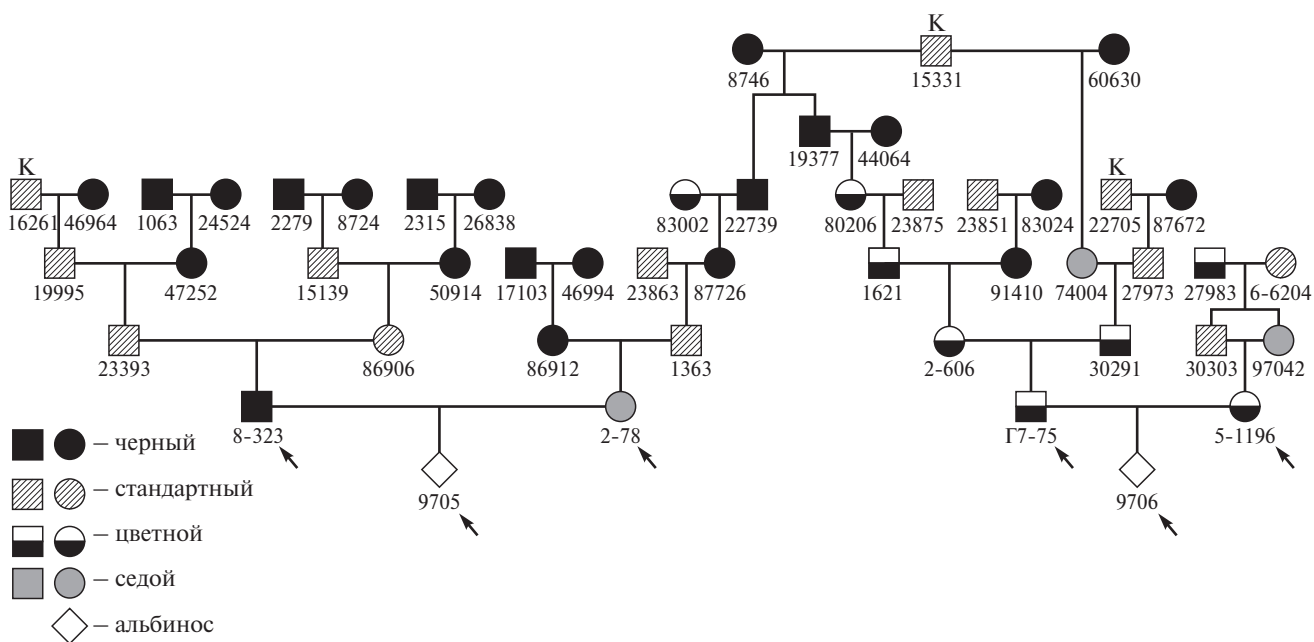
меха, отличающимся от стандартов географических популяций.

Преимущества domestikации и селекция являются основными движущими силами, ответственными за высокий уровень фенотипической изменчивости фермерских популяций пушных зверей. В связи с изменением вектора отбора по сравнению

с природными популяциями (в частности, направленный отбор на разведение особей – носителей мутаций, влияющих на окраску меха), в domestikованных популяциях пушных зверей появились группы зверей различных окрасов меха. В основном это носители рецессивных мутаций в генах, влияющих на проявление окраски меха [12–14].

В исследуемой популяции соболя звероводческого хозяйства «Пушкинский» спустя почти 100 лет отбора в стаде стали фиксировать особей с новыми окрасками меха. Так, в 2005 г. в потомстве пары соболей черной окраски меха родился щенок окраски «пастель». Проведенными исследованиями выявлена однонуклеотидная инсерция в гене *TYRP1* (с.1503dupT), которая привела к фенотипу пастель окраски меха соболя, тип наследования рецессивный. Ген *TYRP1* кодирует связанный с мембраной тирозиназоподобный фермент, который экспрессируется как в меланоцитах, так и в эпителии сетчатки [15]. Далее, в 2022 г. в фермерской популяции зафиксировано рождение щенков соболей с белой окраской меха, анализ наследования этой окраски меха приведен в настоящей работе (рис. 1).

Альбицизм – наследуемая аномалия, проявляется как частичное или полное отсутствие меланинового пигмента, хорошо известное в природе явление, встречающееся как у млекопитающих, так и в других таксономических классах животных. Широко распространены альбиносы среди домашних и лабораторных животных, например, крыса [16] и



**Рис. 2.** Родословная соболей окраски альбинос, результат скрещивания двух линий, родоначальник – самец 15331 (заводской номер). Знаком «К» отмечены особи, завезенные с п-ва Камчатка. Стрелками обозначены индивиды, вошедшие в исследование.

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для амплификации полных последовательностей пяти экзонов, а также сайтов сплайсинга гена *TYR* соболя

Название	Последовательность	Ожидаемый размер продукта, пн	T отжига, °C
TYR_ex1F	GTCTCAGCCAAAACATGTGA	999	58
TYR_ex1R	GATGGGGAGGGAGGTGTAT		
TYR_ex2F	TGGGCAATTTAACTCGTTTT	628	58
TYR_ex2R	TCGTGTGTGTTCAGATTACGG		
TYR_ex3F	TAAATAAGCAGTGGGCATCC	421	60
TYR_ex3R	GTTTCAGGGCTGTTTCTGG		
TYR_ex4F	TGAGGCTTTAACCCACTGAG	526	60
TYR_ex4R	AAGGCTTTGGGGATAACATT		
TYR_ex5F	ACTCCGCAAGGATAATGATG	877	58
TYR_ex5R	TCAGAACTATGGCAGGAAGG		

хорек [17]. Описаны альбино-формы и для экономически ценных пушных зверей, например, лисы [18] и американской норки [19], данный тип окраски пользуется широкой популярностью на рынке пушнины фермерского происхождения.

С молекулярно-генетической точки зрения глазоконный альбинизм (oculocutaneous albinism) обусловливается мутациями в генах *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *OCA2*, *LRMDA* и *SLC24A5* [20]. Следует отметить, что другие синдромы, например, синдром Германски–Пудлака, обусловленный мутациями, обнаруженными по меньшей мере в 11 генах [21], также характеризуются глазоконным альбинизмом [22], такие фенотипы описаны как у человека [20], так и у мыши [23].

Среди млекопитающих у большинства видов альбинизм обусловлен мутациями в гене *TYR* [24], который кодирует тирозиназа-зависимый белок, входящий в структуру тирозиназы и являющийся ключевым в процессе биосинтеза меланина [25]. В связи с этим изучение молекулярно-генетических основ альбинизма у соболя нами было решено начать именно с анализа данного гена. Интересно, что типы и положения мутаций в гене *TYR* сильно различаются внутри вида и между видами. Эти различия повышают интерес к локусу *TYR* также с точки зрения сравнения. В настоящей работе ген соболя *TYR* был исследован как функциональный ген-кандидат на альбинизм.

Для анализа использовали две семейные группы соболей (рис. 2), в которых в 2022 г. одновременно появились щенки-альбиносы.

Родоначальником обеих родословных является самец 15331, завезенный в 1991 г. с п-ва Камчатка.

В линии скрещивания с потомками другого самца, завезенного из этого региона (16261), преобладают черные соболя и звери стандартной окраски. Вторая родословная характеризуется высоким уровнем инбридинга и насыщенностью особями с окраской меха пастель. Представители этих семей (четыре родительские особи стандартной окраски и две особи с окраской альбинос) были генотипированы, дополнительно в анализ был включен один образец ДНК соболя из природной популяции со стандартной (темно-коричневой) окраской мехового покрова. Анализ нуклеотидных последовательностей кодирующей области гена *TYR*, общей длиной 1596 нуклеотидов, что составляет 100% от кодирующей части гена *TYR*, проводили путем прямого секвенирования по Сэнгеру. ПЦР проводили с использованием набора реагентов GenPack PCR Core (Изоген) и праймеров, позволяющих амплифицировать полные последовательности пяти экзонов, а также сайты сплайсинга, гена *TYR* (табл. 1). Полученные в результате ПЦР фрагменты очищали непосредственно из реакционной смеси или вырезали из геля. Очистку проводили с использованием набора Cleanup Standard (Евроген). Секвенсирование реакции проводили с помощью набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) в объеме 10 мкл. Полученные продукты реакции очищали на колонках DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) и секвенировали на приборе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

В результате анализа полученных в ходе секвенирования нуклеотидных последовательностей, как кодирующей области гена *TYR*, так и его сайтов сплайсинга, для соболей-альбиносов не



было выявлено различий от соболей стандартной окраски как из фермерской, так и из природной популяции.

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют отсутствие значимых генетических изменений в кодирующей области гена *TYR* у соболей-альбиносов (Приложение). Это позволяет предположить, что у соболя данный фенотип обусловлен генетическими вариантами в других генах. Целесообразным представляется проведение полногеномного секвенирования у альбиносов и анализа полученных данных.

Соболь — не единственный вид, у которого проявление признаков альбинизма не связано с геном *TYR*. Так, в исследованиях по генотипированию различных пород собак у носителей признака «альбинос» (у нескольких мелких длинношерстных пород собак) выявлена миссенс-мутация в *SLC45A2*, связанная с альбинизмом [26, 27].

Исследование одобрено Этическим комитетом ИОГен РАН 08.05.2024 г., протокол № 6.

Исследования проводились с привлечением средств Фонда РФ, грант № 23-26-00233 от 13.01.2023 г.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тимофеев В. В., Надеев В. Н. Соболь. М.: Заготиздат, 1955. 403 с.
2. Насимович А. А. Соболь, куницы, харза. М.: Наука, 1973. 240 с.
3. Каштанов С. Н. Соболь России: история, племенные и дочерние хозяйства, хронология разведения // Кролиководство и звероводство. 2014. № 6. С. 11–15.
4. Бакеев Н. Н., Монахов Г. И., Сеницын А. А. Соболь. 2-е изд. Вятка, 2003. 336 с.
5. Гептнер В. Г., Наумов Н. П., Юргенсон П. Б. Млекопитающие Советского Союза. Т. 2. Ч. 1. М.: Высш. шк., 1967. 1004 с.
6. Монахов Г. И. Географическая изменчивость и таксономическая структура соболя фауны СССР // Тр. ВНИИОЗ. 1976. Т. 26. С. 54–86.
7. Монахов В. Г. Географическая изменчивость соболя в ареале и филогеография // Экология. 2015. № 3. С. 219–228. DOI: 10.7868/S0367059715030075
8. Каштанов С. Н., Свищёва Г. Р., Пищулина С. Л. и др. Географическая структура генофонда соболя (*Martes zibellina* L.): данные анализа микросателлитных локусов // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 78–88. DOI: 10.7868/S001667581501004X
9. Ranyuk M., Modorov M., Monakhov V., Devyatkin G. Genetic differentiation of autochthonous sable populations in Western and Eastern Siberia // J. Zool. Systematics and Evol. Research. 2021. V. 59. № 8. P. 2539–2552. <https://doi.org/10.1111/jzs.12565>
10. Каштанов С. Н., Сулимова Г. Е., Шевырьков В. Л., Свищёва Г. Р. Селекция соболя России: этапы промышленной доместикиции и генетическая изменчивость // Генетика. 2016. Т. 52. № 9. С. 1001–1011.
11. Свищёва Г. Р., Каштанов С. Н. Репродуктивная стратегия соболя (*Martes zibellina* Linnaeus, 1758): анализ наследования размера приплода в промышленных популяциях // Вестн. ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 444–451.
12. Robinson R. Volume 4. Vertebrates of genetic interest // Handbook of Genetics. V. 4. Boston, MA.: Springer US, 1975. P. 367–398. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4470-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4470-4_18)
13. Trapezov O. V., Trapezova L. I. Whether or not selection can induce variability: model of the american mink (*Mustela vison*) // Paleontol. J. 2016. V. 50. P. 1649–1655.
14. Trapezov O. V. Black crystal: A novel color mutant in the american mink (*Mustela vison schreber*) // J. Heredity. 1997. V. 88. № 2. P. 164–167. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023080>
15. Manakhov A. D., Mintseva M. Yu., Andreeva T. V. Genome analysis of sable fur color links lightened pigmentation phenotype to a frameshift variant in the tyrosinase-related protein 1 gene // Genes. 2021. V. 12. № 2. P. 157. <https://doi.org/10.3390/genes12020157>
16. Blaszczyk W. M., Arning L., Hoffmann K. P., Eppelen J. T. A tyrosinase missense mutation causes albinism in the wistar rat // Pigment Cell Research. 2005. V. 18 № 2. P. 144–145. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00227.x>
17. Blaszczyk W., Distler C., Dekomien G. M. et al. Identification of a tyrosinase (TYR) exon 4 deletion in albino ferrets (*Mustela putorius furo*) // Animal Genetics. 2007. V. 38. № 4. P. 421–423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01619.x>
18. Yan S., Zhao D., Hu M. et al. A single base insertion in the tyrosinase gene is associated with albino phenotype in silver foxes (*Vulpes vulpes*) // Animal Genetics. 2019. V. 50. № 5. P. 550. DOI: 10.1111/age.12816
19. Anistoroaei R., Fredholm M., Christensen K., Leeb T. Albinism in the american mink (*Neovison vison*) is associated with a tyrosinase nonsense mutation // Animal Genetics. 2008. V. 39. № 6. P. 645–648. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01788.x



20. *Amberger J. S., Bocchini C. A., Scott A. F., Hamosh A.* Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D1038–D1043. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1151>
21. *Dessinioti C., Stratigos A. J., Rigopoulos D. & Katsambas A. D.* A review of genetic disorders of hypopigmentation: Lessons learned from the biology of melanocytes // *Experimental Dermatology.* 2009. V. 18. № 9. P. 741–749.
22. *Baxter L. L., Watkins-Chow D. E., Pavan W. J., Loftus S. K.* A curated gene list for expanding the horizons of pigmentation biology // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019. V. 32. № 3. P. 348–358.
23. *Nicholas F. W., Tammen I., Sydney Informatics Hub.* Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). 1995 [dataset]. <https://omia.org/.https://doi.org/10.25910/2AMR-PV70>
24. *Körner A., Pawelek J.* Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin // *Science.* 1982. V. 217. № 4565. P. 1163–1165. DOI: 10.1126/science.6810464
25. *Winkler P. A., Gornik K. R., Ramsey D. T. et al.* A partial gene deletion of SLC45A2 causes oculocutaneous albinism in doberman pinscher dogs // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. P. e92127. DOI: 10.1371/journal.pone.0092127
26. *Hiruni R. Wijesena, Sheila M. Schmutz.* A missense mutation in *SLC45A2* is associated with albinism in several small long haired dog breeds // *J. Heredity.* 2015. V. 106. № 3. P. 285–288. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv008>

## Genomic Analysis of Fur Color of Sable (*Martes zibellina* L.), Search for Mutations that Determine the Absence of Pigmentation – Albino

P. A. Filimonov<sup>1</sup>, A. D. Manakhov<sup>1, 2, 3</sup>, M. I. Mitina<sup>2</sup>, A. A. Onokhov<sup>1</sup>,  
I. E. Chernova<sup>4</sup>, L. V. Maksimova<sup>4</sup>, S. N. Kashtanov<sup>1, \*</sup>, E. I. Rogaev<sup>2, 3, 5</sup>

<sup>1</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

<sup>3</sup>Center for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology,

Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

<sup>4</sup>АО «Russian Sable» Moscow oblast, Pregion, pos. Zverosovkhoz, 141214 Russia

<sup>5</sup>Department of Psychiatry, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01604, USA

\*e-mail: snkashtanov@mail.ru

In the domesticated sable population, after almost 100 years of selection, individuals with colored fur began to be recorded, so, in the offspring of a pair of sables with black fur, a pastel-colored puppy was born. A single-nucleotide insertion was identified in the *TYRP1* gene, which determines this sable fur color; the type of inheritance is recessive. In 2022, in this population, representatives of two sable lines gave birth to puppies with white fur at the same time. In most mammalian species, albinism is caused by mutations in the *TYR* gene, which encodes the enzyme tyrosinase. In the present study, the sable *TYR* gene was investigated as a functional candidate gene for albinism. Analysis of the nucleotide sequences coding for the *TYR* gene region and splicing sites did not reveal differences in white sables from standard-colored sables, suggesting that the phenotype under study is due to genetic variants in other genes.

**Keywords:** *Martes zibellina*, sable, tyrosinase, candidate gene, TYR gene, the splicing site.



*Редколлегия и сотрудники редакции  
горячо и сердечно поздравляют дорогого  
Виталия Анатольевича Пухальского с юбилеем!!!*

Имя этого выдающегося биолога-генетика известно во всем мире. Виталий Анатольевич — один из основателей генетики растений в России, ведущий специалист в этой области. За годы сотрудничества с журналом он опубликовал в «Генетике» более 300 статей. С 1989 по 2016 г. входил в состав редколлегии, за эти годы В. А. Пухальский внес огромный вклад в развитие и процветание нашего журнала.

Дорогой, глубокоуважаемый Виталий Анатольевич,  
благодарим Вас за многолетнее сотрудничество!  
Желаем дальнейших творческих успехов, крепкого здоровья,  
благополучия Вашей семье!