Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

На правах рукописи



Аракелян Нелли Арамовна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕПРОДУКТИВНОГО И ПОСТРЕПРОДУКТИВНОГО СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ У ПЛАЦЕНТАРНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1.5.7. Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН
Рогаев Евгений Иванович

Федеральная территория «Сириус»
2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....6

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....13

1.1. Репродуктивное старение и продолжительность репродуктивного периода у млекопитающих.....13

1.2. Репродуктивное долголетие и плодовитость у соболя (*Martes zibellina*).....19

1.3. Отложенная имплантация как репродуктивная стратегия куньих (Mustelidae).....22

1.4. Генетические причины нарушений созревания ооцита, оплодотворения и раннего эмбрионального развития.....27

1.5. Пострепродуктивное долголетие у зубатых китов (Odontoceti).....31

1.6. Интегративные подходы к анализу генетических факторов сложных фенотипов. 36

1.7. Заключение по обзору литературы.....38

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....40

2.1. Общий дизайн исследования.....40

2.2. Сравнительно-геномный анализ эволюционно ускоренных регионов.....41

2.2.1. Виды плацентарных млекопитающих с различной выраженностью репродуктивного старения.....41

2.2.2. Виды отряда Хищные с различными особенностями регуляции сроков репродуктивного процесса.....42

2.2.3. Представители парвотряда Зубатые киты с различной продолжительностью пострепродуктивного периода.....43

2.2.4. Филогенетическая характеристика исследуемых видов.....43

2.2.5. Выявление общих эволюционно ускоренных геномных регионов.....44

2.2.6. Геномная аннотация эволюционно ускоренных регионов и определение связанных с ними генов.....46

2.2.7. Сопоставление эволюционно ускоренных регионов с регуляторными и эпигеномными данными.....48

2.2.8. Функциональный анализ и сопоставление с данными об экспрессии генов…50

2.2.9. Анализ изменений сайтов связывания транскрипционных факторов.....51

2.3. Полногеномный и популяционно-генетический анализ соболей с различной продолжительностью репродуктивного периода и плодовитостью.....52

2.3.1. Характеристика выборки и формирование исследуемых групп.....52

2.3.2. Выделение геномной ДНК и полногеномное секвенирование.....54

2.3.3. Выравнивание прочтений и выявление генетических вариантов.....55

2.3.4. Анализ генетической структуры популяций на основе полногеномных данных 55

2.3.5. Идентификация регионов, находящихся под действием отбора.....56

2.3.6. Идентификация генетических вариантов, связанных с длительным сохранением репродуктивной функции.....56

2.3.7. Анализ эволюционной консервативности аминокислотных позиций.....57

2.4. Молекулярно-генетическое исследование пациенток с нарушениями функции ооцитов.....58

2.4.1. Клиническая и эмбриологическая характеристика пациенток.....58

2.4.2. Выделение геномной ДНК и полногеномное секвенирование.....59

2.4.3. Выравнивание прочтений, выявление и приоритизация генетических вариантов.....59

2.4.4. In silico оценка функциональной значимости генетических вариантов пациенток.....60

2.4.5. Подтверждение выявленных вариантов методом секвенирования по Сэнгеру 60

2.4.6. Анализ транскриптомных данных.....61

2.5. Интегративный анализ результатов.....61

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....63

3.1. Эволюционно ускоренные геномные регионы у плацентарных млекопитающих (Placentalia) с длительным сохранением репродуктивной функции.....63

3.1.1. Общие эволюционно ускоренные геномные регионы у плацентарных млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции.....63

3.1.2. Распределение эволюционно ускоренных регионов по генам у исследуемых видов.....65

3.1.3. Функциональная характеристика генов с эволюционно ускоренными регионами..... 69

3.2. Генетические факторы репродуктивного долголетия у соболя (*Martes zibellina*). .71

3.2.1. Анализ генетической структуры выборки на основе полногеномных данных 71

3.2.2. Геномные регионы, потенциально находящиеся под действием отбора.....74

3.2.3. Генетические варианты, ассоциированные с репродуктивным долголетием у соболя.....77

3.3. Эволюционно-генетические механизмы отложенной имплантации у куньих (Mustelidae).....82

3.3.1. Общие эволюционно ускоренные геномные регионы у куньих с отложенной имплантацией.....82

3.3.2. Аннотация генов, связанных с эволюционно ускоренными регионами у куньих, и функциональный анализ.....85

3.3.3. Кандидатные гены, ассоциированные с отложенной имплантацией.....87

3.4. Молекулярно-генетические причины нарушений репродуктивной функции при патологии ооцитов у человека.....91

3.4.1. Вариант TUBB8 p.(Ser176Leu) при остановке созревания ооцитов.....91

3.4.2. Вариант ZP4 p.(Leu342Pro) у пациентки с аномальной структурой блестящей оболочки.....94

3.5. Эволюционно-генетические механизмы пострепродуктивного долголетия у зубатых китов (Odontoceti).....98

3.5.1. Эволюционно ускоренные геномные регионы у зубатых китов с длительным пострепродуктивным периодом.....98

3.5.2. Регуляторная характеристика эволюционно ускоренных геномных регионов у зубатых китов с продолжительным пострепродуктивным периодом.....103

3.5.3. Гены, связанные с эволюционно ускоренными регионами у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием, и их функциональный анализ.....107

3.6. Интегративный анализ результатов геномных исследований.....111

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....121

ВЫВОДЫ.....124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....125

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....129

ПРИЛОЖЕНИЕ А Характеристика видов, использованных в межвидовых сравнительно-геномных исследованиях.....151

ПРИЛОЖЕНИЕ Б Филогенетические взаимоотношения видов, включенных в анализ отложенной имплантации.....153

ПРИЛОЖЕНИЕ В Дополнительные результаты анализа эволюционно ускоренных геномных регионов у плацентарных млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции.....154

ПРИЛОЖЕНИЕ Г Дополнительные материалы полногеномного исследования соболей с репродуктивным долголетием.....164

ПРИЛОЖЕНИЕ Д Дополнительные результаты анализа эволюционно ускоренных геномных регионов у куньих с отложенной имплантацией.....172

ПРИЛОЖЕНИЕ Е Дополнительные результаты анализа генетических вариантов у женщин с нарушениями созревания ооцитов и аномалиями структуры блестящей оболочки 179

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж Дополнительные результаты сравнительно-геномного анализа эволюционно ускоренных регионов у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием 181

ПРИЛОЖЕНИЕ И Дополнительные результаты интегративного анализа генов, выявленных при исследовании репродуктивного и пострепродуктивного долголетия у плацентарных млекопитающих.....191

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Продолжительность жизни и темпы старения значительно различаются между видами, что отражает разнообразие жизненных стратегий, сформировавшихся в ходе эволюции [1–3]. Эти различия рассматриваются в контексте основных эволюционных теорий старения, в которых особое внимание уделяется связи между поддержанием жизнеспособности организма и размножением. Согласно этим представлениям, естественный отбор действует на признаки, определяющие как выживание, так и репродуктивный успех, а распределение ресурсов между размножением и поддержанием соматических функций рассматривается как один из факторов, влияющих на продолжительность жизни [4–6]. Однако современные исследования показывают, что эта взаимосвязь значительно сложнее, чем простой компромисс между плодовитостью и долголетием, и обусловлена взаимодействием множества физиологических и молекулярных механизмов [6,7].

Особенно наглядно связь размножения и старения проявляется в возрастной динамике репродуктивной функции. У одних видов млекопитающих способность к размножению сохраняется до позднего возраста, тогда как у других снижение репродуктивных показателей начинается значительно раньше. Сравнительный анализ млекопитающих выявил существенные межвидовые различия как по возрасту начала снижения репродуктивной функции, так и по скорости последующих изменений [8]. Следовательно, продолжительность репродуктивного периода не находится в постоянном соотношении с общей продолжительностью жизни, а является самостоятельным эволюционно изменчивым признаком [8,9].

Особым случаем является физиологическое прекращение репродуктивной функции задолго до окончания жизни. Продолжительный пострепродуктивный период встречается среди млекопитающих редко [9,10]. Сам факт его существования позволяет предположить, что продолжительность репродуктивного периода и общая продолжительность жизни, несмотря на их тесную взаимосвязь, могут изменяться в ходе эволюции неодинаково [11]. Возникает закономерный вопрос о молекулярно-генетической основе этой изменчивости. Различные варианты сохранения и прекращения репродуктивной функции могут быть связаны со специфическими генетическими изменениями, возникшими независимо в отдельных эволюционных линиях. Вместе с тем результаты работ по исследованию старения и долголетия указывают на то, что существенные различия между видами могут быть обусловлены особенностями работы общих, эволюционно консервативных механизмов [1,12,13]. При этом

различные молекулярные изменения могут затрагивать одни и те же биологические процессы и приводить к сходным функциональным последствиям [2,13].

Такое сходство на уровне биологических процессов может быть характерно и для механизмов, определяющих продолжительность репродуктивной функции. Формирование и длительное сохранение репродуктивной функции зависят от качества половых клеток, стабильности генома, нормального прохождения клеточного цикла и согласованной регуляции метаболических, клеточных и тканевых процессов [7,14,15]. Многие из этих процессов одновременно имеют важное значение для поддержания жизнеспособности организма в целом. Экспериментальные исследования также показывают, что состояние репродуктивной системы может влиять на продолжительность жизни, а ряд механизмов регуляции старения участвует в поддержании качества половых клеток и репродуктивной функции [7,14,16,17]. Таким образом, некоторые механизмы, участвующие в поддержании репродуктивной функции, могут быть одновременно связаны с поддержанием жизнеспособности и долголетия организма [7].

Несмотря на имеющиеся данные, остается открытым вопрос о молекулярно-генетической основе различий в продолжительности репродуктивного и пострепродуктивного периодов у млекопитающих. В частности, недостаточно изучены генетические факторы и биологические процессы, связанные с длительным сохранением репродуктивной функции и пострепродуктивным долголетием.

Особую ценность для изучения этих механизмов представляют виды млекопитающих, характеризующиеся необычными особенностями репродуктивной биологии и продолжительности жизни. К ним относятся виды, сохраняющие способность к размножению до позднего возраста, виды с продолжительным пострепродуктивным периодом, а также виды с особыми механизмами регуляции репродуктивного процесса, в частности с отложенной имплантацией эмбриона. Сравнительное исследование таких видов позволяет выявлять генетические изменения, связанные с особенностями репродуктивной биологии, и получать представление о молекулярных основах различных репродуктивных стратегий.

Целью исследования является идентификация и сравнительный анализ молекулярно-генетических факторов, связанных с сохранением, регуляцией и нарушением репродуктивной функции, а также с пострепродуктивным долголетием у плацентарных млекопитающих.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести сравнительно-геномный анализ плацентарных млекопитающих (Placentalia) для выявления геномных регионов с признаками ускоренной эволюции у видов с длительным сохранением репродуктивной функции.

2. Выполнить полногеномный анализ самок соболя (*Martes zibellina*) с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью в сопоставлении с контрольными группами фермерских и диких самок.
3. Провести сравнительно-геномный анализ представителей семейства куньих (Mustelidae) для выявления геномных регионов с признаками ускоренной эволюции у видов с отложенной имплантацией эмбриона.
4. Провести сравнительно-геномный анализ зубатых китов (Odontoceti) для выявления геномных регионов с признаками ускоренной эволюции у видов с продолжительным пострепродуктивным периодом.
5. Провести поиск и аннотацию редких генетических вариантов у женщин с нарушениями репродуктивной функции.

Объект исследования

Плацентарные млекопитающие с различной продолжительностью сохранения репродуктивной функции; соболи, различающиеся по продолжительности репродуктивного периода и плодовитости; представители семейства куньих, характеризующиеся феноменом отложенной имплантации; пациентки с нарушениями функции ооцитов; зубатые киты с различной продолжительностью пострепродуктивного периода.

Предмет исследования

Молекулярно-генетические особенности, связанные с репродуктивным долголетием, плодовитостью, регуляцией репродуктивной функции, нарушениями функции ооцитов и пострепродуктивным долголетием у плацентарных млекопитающих.

Научная новизна

В работе впервые получены комплексные данные о геномных особенностях млекопитающих, включая человека, характеризующихся различной продолжительностью репродуктивного и пострепродуктивного периодов, а также другими особенностями репродуктивной биологии. У филогенетически удаленных видов плацентарных млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции впервые выявлены общие консервативные геномные регионы с признаками ускоренной эволюции. Впервые проведен популяционно-геномный анализ самок соболя с повышенной плодовитостью и сохранением репродуктивной функции в позднем возрасте в сравнении с контрольными группами фермерских и диких самок и

выявлены геномные регионы с признаками отбора и генетические варианты, различающиеся по встречаемости между группами. У представителей семейства куньих с отложенной имплантацией впервые выявлены общие геномные регионы с признаками ускоренной эволюции. У пациентки с нарушением репродуктивной функции выявлен и охарактеризован редкий миссенс-вариант в гене *ZP4* p.(Leu342Pro). У представителей парвоотряда зубатых китов с продолжительным пострепродуктивным периодом впервые выявлены общие геномные регионы с признаками ускоренной эволюции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют представления о молекулярно-генетических основах репродуктивного и пострепродуктивного долголетия у плацентарных млекопитающих. Сопоставление данных о длительном сохранении и регуляции репродуктивной функции, о ее генетически обусловленных нарушениях, а также о пострепродуктивном долголетии позволяет рассматривать эти явления в рамках общей проблемы взаимосвязи репродуктивного и соматического старения. Кандидатные генетические варианты, обнаруженные у соболей, представляют интерес для дальнейшего изучения репродуктивного долголетия и практического использования в селекционной работе. Результаты исследования редких кандидатных вариантов, выявленных у женщин с нарушениями функции ооцитов, могут быть использованы при интерпретации результатов молекулярно-генетической диагностики женского бесплодия.

Методология и методы исследования

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач был использован комплекс современных молекулярно-генетических, популяционно-генетических и биоинформатических методов. В работе использовали полногеномное секвенирование и секвенирование по Сэнгеру, анализ генетических вариантов, анализ популяционной структуры с помощью ADMIXTURE и метода главных компонент, оценку межгрупповой генетической дифференциации (F_{ST}) и нуклеотидного разнообразия (π), сравнительно-геномный анализ эволюционно консервативных и ускоренных регионов, функциональную и регуляторную аннотацию, статистический анализ и *in silico* оценку функциональной значимости генетических вариантов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Куньи (Mustelidae) с отложенной имплантацией эмбриона характеризуются общими геномными регионами с признаками ускоренной эволюции.
2. Фермерские самки соболя (*Martes zibellina*, Mustelidae) с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью отличаются от контрольных фермерских самок по наличию миссенс-вариантов в генах *ASPM* и *VGLL4*, функции которых связаны с регуляцией репродуктивных процессов.
3. Для групп плацентарных млекопитающих, характеризующихся повышенной продолжительностью репродуктивного или пострепродуктивного периодов, выявлены общие внутри каждой группы геномные регионы с признаками ускоренной эволюции.

Личный вклад автора

Основная часть представленных в диссертации исследований выполнена автором самостоятельно. Автором проведен сравнительно-геномный анализ эволюционно ускоренных регионов, связанных с репродуктивным долголетием у плацентарных млекопитающих, отложенной имплантацией у куньих и длительным пострепродуктивным периодом у зубатых китов, а также выполнены функциональная аннотация и биологическая интерпретация результатов. Проведено полногеномное секвенирование самок соболя с репродуктивным долголетием и женщины с нарушением функции ооцитов, выполнены биоинформатический анализ данных и интерпретация выявленных вариантов. Автором также выполнен интегративный анализ результатов исследований и внесен непосредственный вклад в подготовку научных публикаций по теме диссертации.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных молекулярно-генетических, сравнительно-геномных, популяционно-генетических, биоинформатических и статистических методов исследования, контролем качества исходных данных, применением соответствующих методов статистической оценки, использованием сравнительных групп и сопоставлением результатов с внешними генетическими и функциональными данными. По результатам научного исследования опубликовано шесть статей в изданиях, индексируемых международными базами данных и рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации:

1. Arakelyan N. A., Manakhov A. D., Izotova G. V., Abramova M. N., Rogaev E. I. Identification of Accelerated Regions Associated with Extended Post-Reproductive Lifespan in Toothed Whales // Frontiers in Ecology and Evolution. 2026. Vol. 14. Article 1911090. DOI: 10.3389/fevo.2026.1911090.

2. Arakelyan N.A., Grigorenko A.P., Petrova V.M., Vasilevskaya E., Islamgulov D.V., Dolgikh A.V., Manakhov A.D. The Identification of Genetic Factors Contributing to Human Oocyte Maturation Arrest Using Whole-Genome Sequencing // Russian Journal of Genetics. 2025. Vol. 61. No. 6. P. 736–740. DOI: 10.1134/S1022795425700267.

3. Arakelyan N., Reshetov D., Yakovenko S., Kosorukova I., Islamgulov D., Andreeva T. An Extremely Rare *ZP4* Missense Variant in a Patient with Abnormal Zona Pellucida Morphology and Female Infertility: A Case Report // Reports. 2026. Vol. 9. No. 3. Article 260. DOI: 10.3390/reports9030260.

4. Arakelyan N.A., Kupriyanova D.A., Vasilevska J., Rogaev E.I. Sexual dimorphism in immunity and longevity among the oldest old // Frontiers in Immunology. 2025. Vol. 16. Article 1525948. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1525948.

5. Arakelyan N. A., Vasilevska J., Rogaev E. I. The Effects of Assisted Reproductive Technologies on De Novo Mutations // Acta Naturae. 2025. Vol. 17. No. 2. P. 4–14. DOI: 10.32607/actanaturae.27589.

6. Vasilevska J., Arakelyan N.A., Kungurtseva A.L., Vitebskaya A.V., Rogaev E.I. Brain Dysfunction in Genetically Determined Accelerated Aging Syndromes // Aging and Disease. 2026. DOI: 10.14336/AD.2026.0370.

Результаты диссертационной работы были представлены на шести научных конференциях и форумах: XV Международной конференции мКАРМ «Краеугольные аспекты репродуктивной медицины» (Москва, 2023), XXXIII Ежегодной международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Нижний Новгород, 2023), Международной конференции мКАРМ «Краеугольные аспекты репродуктивной медицины» (Москва, 2025), XV Международной мультиконференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» (BGRS/SB-2026, Новосибирск, 2026), Международной научной конференции молодых ученых OpenBio-2026 (Кольцово, 2026) и II Форуме генетических технологий «Сириус. ТехноГенетика» (Сириус, 2026).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и заключения. Работа изложена на 150 страницах, содержит 39 рисунков, 3 таблицы и 8 приложений.

Финансовая поддержка диссертации

Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение №18-03 от 10 сентября 2024 г.).

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д.б.н., профессору Е.И. Рогаеву, под руководством которого выполнена данная работа, а также к.б.н. А.Д. Манахову за помощь на всех этапах исследования. Автор также благодарит сотрудников направления «Генетика» Университета «Сириус» и Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН за предоставление образцов для исследования, поддержку и ценные научные обсуждения. Особую благодарность автор выражает своей семье за понимание и поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Репродуктивное старение и продолжительность репродуктивного периода у млекопитающих

Старение организма сопровождается постепенными изменениями функций тканей и органов. Скорость изменений и их интенсивность могут значительно варьировать для разных систем организма. Особый интерес представляет репродуктивная система, поскольку способность к размножению может снижаться задолго до окончания жизни. Репродуктивное старение представляет собой возрастное снижение репродуктивного успеха, которое может проявляться уменьшением плодовитости, ухудшением качества половых клеток и снижением вероятности успешного размножения. Полное прекращение размножения является возможным конечным этапом этого процесса, но не его обязательным проявлением [18].

Репродуктивная функция самок млекопитающих обеспечивается последовательностью взаимосвязанных процессов, включающих формирование и сохранение запаса половых клеток, рост и созревание фолликулов, созревание ооцитов, овуляцию, оплодотворение и последующее развитие беременности. С возрастом эффективность ряда этих процессов снижается. Одним из ключевых компонентов репродуктивного старения у самок является старение яичников, связанное с истощением фолликулярного резерва и снижением качества ооцитов [19,20]. В сравнительном исследовании 101 вида млекопитающих признаки репродуктивного старения были выявлены примерно у двух третей исследованных видов (Рисунок 1). При этом возраст начала и скорость последующего снижения репродуктивной функции существенно различались между видами [8].

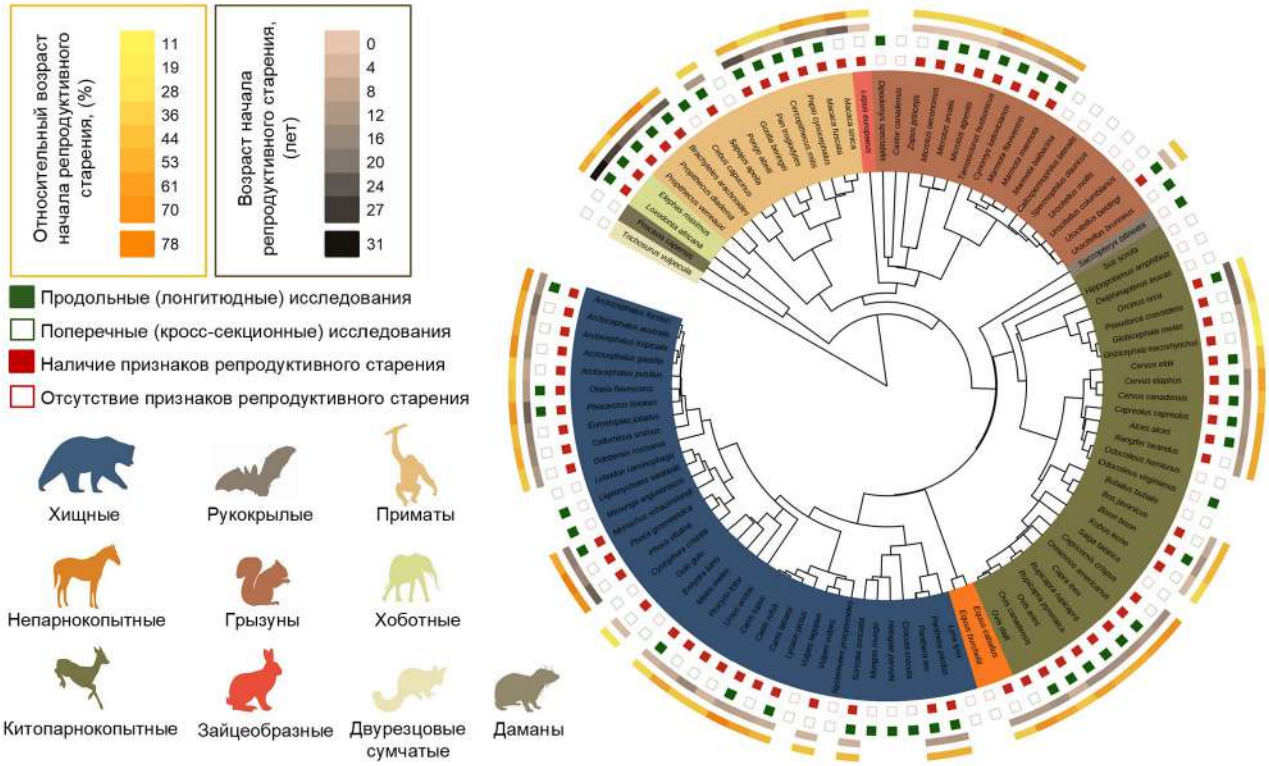


Рисунок 1 – Репродуктивное старение самок млекопитающих в филогенетическом контексте. Внутреннее кольцо отражает наличие или отсутствие признаков репродуктивного старения, среднее – возраст начала репродуктивного старения в годах, внешнее – относительный возраст его начала, рассчитанный как отношение возраста начала репродуктивного старения к возрасту наиболее старой особи в исследованной популяции (адаптировано из [8])

Межвидовые различия в репродуктивном старении частично связаны с особенностями жизненного цикла. У видов с большей массой тела и более поздним возрастом первого размножения снижение репродуктивной функции в среднем начинается в более старшем возрасте и протекает медленнее [8,21]. Однако межвидовые различия в репродуктивном старении определяются не только темпом жизненного цикла, но и особенностями репродуктивной биологии, включая характер спаривания и тип овуляции [8].

Связь репродуктивного старения с жизненным циклом согласуется с основными эволюционными теориями старения. Согласно классической модели Гамильтона, действие естественного отбора на признаки, определяющие выживание и размножение, ослабевает с возрастом по мере уменьшения ожидаемого будущего репродуктивного вклада [4]. Теория антагонистической плейотропии предполагает, что генетические варианты, повышающие приспособленность в молодом возрасте, могут сохраняться естественным отбором даже в том случае, если позднее их действие становится неблагоприятным [22]. В теории одноразовой сомы старение рассматривается в контексте распределения ограниченных ресурсов между размножением и поддержанием функционального состояния организма [5]. В рамках этих представлений продолжительность сохранения репродуктивной функции зависит от того, как в

ходе эволюции вида распределен репродуктивный вклад на протяжении жизни и насколько длительное поддержание репродуктивной системы влияет на приспособленность.

Таким образом, сравнительные исследования выявляют общие закономерности репродуктивного старения, однако причины значительных межвидовых различий в сроках и скорости снижения репродуктивной функции остаются недостаточно изученными. Молекулярные и клеточные механизмы этого процесса наиболее подробно исследованы у человека и лабораторных животных. Одним из основных проявлений репродуктивного старения у самок являются возрастные изменения яичников. С возрастом в них уменьшается число фолликулов и снижается качество ооцитов. Оба процесса имеют ключевое значение для сохранения репродуктивной функции: количество фолликулов определяет продолжительность работы яичников, а качество ооцитов – возможность успешного оплодотворения и развития эмбриона [19,20].

У большинства изученных млекопитающих основной запас ооцитов формируется на ранних этапах жизни и сохраняется в составе примордиальных фолликулов. С возрастом этот запас постепенно уменьшается вследствие активации фолликулов и их атрезии. Наряду с сокращением овариального резерва происходят возрастные изменения самих ооцитов, приводящие к снижению их качества. Важной особенностью женских половых клеток является длительная остановка мейоза: ооцит может сохраняться в профазе первого мейотического деления на протяжении значительной части жизни самки. Такое длительное существование требует сохранения целостности хромосом и нормальной работы молекулярных механизмов, обеспечивающих последующее завершение мейоза. С возрастом нарушается когезия сестринских хроматид, увеличивается частота дефектов веретена деления и ошибок расхождения хромосом, что приводит к повышению частоты анеуплоидии [23,24]. Важную роль в возрастном снижении качества ооцитов играет также накопление повреждений ДНК. Нарушение механизмов их репарации может приводить к гибели ооцитов или снижению их способности к нормальному созреванию и развитию после оплодотворения. Таким образом, поддержание геномной стабильности имеет значение как для сохранения овариального резерва, так и для функционального состояния половых клеток. Старение яичников связано и с другими клеточными изменениями, включая нарушение функции митохондрий и энергетического обмена, усиление окислительного стресса, изменения эпигенетической регуляции и протеостаза [19].

Возрастные изменения происходят не только в ооцитах, но и в окружающих их соматических клетках, что постепенно изменяет условия роста и созревания фолликулов. Одноклеточное РНК-секвенирование яичников молодых и репродуктивно старых мышей позволило выявить почти двукратное увеличение доли иммунных клеток и изменения

экспрессии генов в стромальных фибробластах, связанных с развитием фиброза [25]. Эти изменения обнаруживались еще до полного истощения фолликулярного резерва. Пространственный транскриптомный анализ яичников приматов также выявил возрастные изменения соматических клеток, сопровождавшиеся усилением воспалительных и фибротических процессов, признаками клеточной сенесценции и изменением межклеточных взаимодействий [26].

При исследовании яичника человека возрастные изменения были выявлены в восьми основных типах клеток [27]. В ооцитах изменялась экспрессия генов, участвующих в клеточном ответе на повреждения ДНК, а в гранулезных, тека- и стромальных клетках с возрастом снижалась экспрессия *FOXP1*. Функциональное значение этого гена было подтверждено экспериментально. Подавление *Foxp1* у мышей приводило к развитию признаков преждевременного истощения яичников [27]. Анализ транскриптома и доступности хроматина в отдельных ядрах клеток яичника дополнил эти данные. С возрастом повышалась экспрессия генов, связанных с сигнальными путями mTOR и инсулина, тогда как экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием, протеасомной системой и эксцизионной репарацией оснований, снижалась [28]. В совокупности эти результаты показывают, что старение яичников сопровождается изменениями как самих ооцитов, так и клеток, обеспечивающих их рост и созревание.

Наиболее подробно генетические факторы репродуктивного старения изучены у человека. В качестве количественного признака в большинстве таких исследований используют возраст естественной менопаузы. Он не совпадает с возрастом начала снижения фертильности, однако отражает продолжительность функционирования яичников и связан со скоростью истощения фолликулярного резерва [29]. Полногеномные исследования этого признака последовательно указывают на роль генов, участвующих в поддержании стабильности генома.

В одном из первых крупных метаанализов были выявлены 13 новых локусов, связанных с возрастом естественной менопаузы [30]. Среди расположенных в этих локусах генов были *EXO1, HELQ, UIMC1, FANCI, TLK1, POLG и PRIM1*, участвующие в репликации и репарации ДНК. При дальнейшем увеличении выборки примерно до 70 тыс. женщин были выявлены 44 региона, содержащие генетические варианты, связанные с возрастом естественной менопаузы. Наиболее выраженные результаты по функциональному обогащению генов с генетическими вариантами также были связаны с клеточным ответом на повреждения ДНК. В число кандидатных генов вошел *BRCA1*, участвующий в репарации двуцепочечных разрывов ДНК [31].

Исследование около 200 тыс. женщин позволило выявить уже 290 генетических вариантов, связанных с возрастом естественной менопаузы [15]. Связанные с ними гены были вовлечены в распознавание и репарацию повреждений ДНК, регуляцию клеточного цикла и

мейотическую рекомбинацию. Для отдельных генов их влияние на состояние овариального резерва было подтверждено экспериментально. У мышей наличие дополнительной копии *Chek1* способствовало сохранению фолликулярного резерва, тогда как отсутствие *Chek2* замедляло его истощение и увеличивало продолжительность репродуктивного периода [15]. Эти данные непосредственно связывают механизмы контроля повреждений ДНК с сохранением фолликулярного резерва.

Исследование редких кодирующих вариантов позволило выявить девять генов, связанных с возрастом естественной менопаузы, включая *ZNF518A* и *PNPLA8*, а также гены, участвующие в репарации ДНК и поддержании стабильности генома: *CHEK2, HELB, HROB, BRCA2, ETAA1, PALB2* и *SAMHD1* [32].

Таким образом, генетические исследования возраста естественной менопаузы указывают на роль механизмов поддержания геномной стабильности, прежде всего репарации ДНК, контроля клеточного цикла и мейоза. Эти результаты согласуются с данными о возрастных изменениях ооцитов, для которых характерны накопление повреждений ДНК и увеличение частоты нарушений мейоза. Вместе с тем большая часть этих данных получена у человека и модельных животных и не позволяет объяснить, какие генетические изменения лежат в основе межвидовых различий в продолжительности сохранения репродуктивной функции.

Для выявления генетической основы межвидовых различий необходим сравнительно-геномный подход. Однако сравнительная геномика старения млекопитающих преимущественно сосредоточена на другом фенотипе – общей продолжительности жизни. В исследованиях долгоживущих видов анализировались изменения белок-кодирующих последовательностей, число копий генов, транскриптомные особенности и другие геномные признаки, связанные с максимальной продолжительностью жизни [33–35]. Однако репродуктивная система может стареть с иной скоростью, чем организм в целом, а межвидовые различия в продолжительности жизни не определяют однозначно сроки снижения репродуктивной функции. Поэтому результаты исследований общего долголетия не позволяют непосредственно объяснить межвидовые различия в репродуктивном старении.

Сравнительные геномные и транскриптомные подходы применялись и для изучения эволюции репродуктивных признаков. Исследовались изменения регуляции генов эндометрия, связанные с эволюцией беременности у плацентарных млекопитающих, включая вклад транспозонов в формирование новых регуляторных сетей [36,37], а также молекулярные особенности плацентации и лактации у сумчатых и плацентарных млекопитающих [38].

В другом сравнительном исследовании Wu et al. были проанализированы признаки репродуктивного жизненного цикла млекопитающих. Авторы исследовали 1204 однокопийных гена у 89 видов млекопитающих и сопоставили изменения скорости их эволюции с

продолжительностью беременности, размером помета, возрастом полового созревания самок, сроками прекращения молочного вскармливания и достижения потомством самостоятельности [39]. Были выявлены гены, изменения эволюционной скорости которых связаны с отдельными репродуктивными признаками. Однако возраст начала и скорость репродуктивного старения в этом исследовании не анализировались.

Одним из подходов к исследованию эволюции фенотипических признаков позвоночных является выявление консервативных участков генома, характеризующихся повышенной скоростью нуклеотидных замен в отдельных эволюционных линиях. Такие изменения могут затрагивать как кодирующие, так и некодирующие последовательности, включая регуляторные элементы. Holloway et al. [40] выявили ускоренные регионы в предковой линии сумчатых и плацентарных млекопитающих и экспериментально подтвердили регуляторную активность ряда некодирующих участков. В работе Ferris et al. [41] при сравнении видов млекопитающих с различными фенотипическими особенностями были выявлены ускоренные регионы, в том числе вблизи генов, участвующих в ответе на повреждения ДНК у слонов. В последующих исследованиях аналогичный подход применяли при сравнении геномов слонов и приматов, а также для выявления ускоренных некодирующих регионов в эволюционных линиях, ведущих к современным млекопитающим и птицам [42–44].

Функциональная значимость ряда некодирующих последовательностей, выявленных при анализе ускоренной эволюции, была подтверждена экспериментально. Так, Bi et al. [43] выявили специфичные для гиббонов ускоренные регионы вблизи генов *DLX5* и *EMX2*, участвующих в развитии скелета. В экспериментах на трансгенных эмбрионах мышей с использованием репортерных конструкций было показано, что последовательности этих регионов у гиббонов обладают более выраженной энхансерной активностью в развивающихся конечностях и плечевых суставах по сравнению с ортологичными последовательностями человека и макаки-резуса. В исследовании Trigila et al. [44] энхансерная активность была экспериментально подтверждена на трансгенных рыбах *Danio rerio* для пяти некодирующих регионов с наиболее выраженным ускорением эволюции в предковой линии млекопитающих. Дополнительное исследование ортологичных последовательностей ЭУР в области гена *NPAS3* показало, что ускоренная эволюция отдельных участков могла сопровождаться приобретением или утратой энхансерной активности. Эти результаты демонстрируют возможность использования сравнительно-геномного анализа для выявления функционально значимых регуляторных последовательностей.

Особый интерес представляет выявление ортологичных консервативных участков генома, характеризующихся ускоренной эволюцией у филогенетически удаленных видов со сходными признаками. Так, Ferris и Gregg [45] обнаружили подобные регионы у млекопитающих,

впадающих в спячку, причем они были преимущественно расположены вблизи генов, связанных с предрасположенностью человека к ожирению. В дальнейшем Nakayama и Makino [46] выявили эволюционно ускоренные некодирующие регионы у видов из пяти эволюционных линий млекопитающих, впадающих в спячку, и установили общность ряда биологических процессов, представленных генами, расположенными вблизи этих регионов. При сравнении филогенетически удаленных групп птиц с независимо возникшим укорочением цевки также были выявлены консервативные некодирующие элементы, характеризующиеся ускоренной эволюцией в нескольких эволюционных линиях [47]. Эти исследования демонстрируют возможность использования эволюционно ускоренных регионов для поиска геномных участков и биологических процессов, потенциально связанных с формированием сходных фенотипов у эволюционно удаленных видов.

Таким образом, сравнительно-геномные исследования позволили идентифицировать генетические и регуляторные изменения, связанные с различными фенотипическими особенностями млекопитающих, включая репродуктивные признаки. Вместе с тем геномные изменения, связанные именно с длительным сохранением репродуктивной функции у филогенетически удаленных плацентарных млекопитающих, остаются недостаточно изученными.

1.2. Репродуктивное долголетие и плодовитость у соболя (*Martes zibellina*)

Репродуктивное старение характеризуется значительной вариабельностью не только между видами, но и между отдельными особями одного вида. Внутривидовые различия в продолжительности сохранения репродуктивной функции представляют особый интерес для поиска генетических факторов, связанных с репродуктивным долголетием. Соболь (*Martes zibellina*) является перспективным объектом для изучения длительного сохранения репродуктивной функции. Размножение этого вида характеризуется выраженной сезонностью и отложенной имплантацией: спаривание происходит летом, после чего развитие бластоцисты на длительный период задерживается, а активное эмбриональное развитие возобновляется незадолго до рождения потомства [48]. Самки не сразу реализуют полный репродуктивный потенциал после достижения половой зрелости. В природных популяциях показатели беременности и потенциальной плодовитости существенно возрастают после первых репродуктивных сезонов, а взрослые самки характеризуются более стабильным воспроизводством [48]. Возрастная динамика репродукции особенно хорошо прослеживается у

соболей, содержащихся в условиях звероводческих хозяйств. У молодых самок доля успешных беременностей сравнительно невелика и увеличивается в последующие годы жизни. По данным многолетних наблюдений, наиболее высокие показатели воспроизводства характерны для взрослых животных: у клеточных соболей высокая плодовитость может сохраняться в возрасте 6–10 лет, а отдельные самки продолжают размножаться значительно дольше [49–51]. В литературе описаны случаи длительного сохранения репродуктивной функции, в том числе рождение потомства самкой в возрасте 19 лет, а также высокая суммарная плодовитость отдельных особей, достигавшая 53-57 детенышей за жизнь [50].

Таким образом, соболь характеризуется значительной индивидуальной вариабельностью продолжительности репродуктивного периода, что проявляется в различиях между самками по длительности сохранения способности к размножению. Именно наличие таких различий создает возможность поиска генетических факторов, связанных с длительным сохранением репродуктивной функции.

В природных популяциях оценка репродуктивного долголетия осложняется высокой внешней смертностью и ограниченным числом животных старших возрастных групп. В связи с этим особую ценность представляют данные звероводческих хозяйств, где возможно наблюдение за последовательными репродуктивными событиями одной и той же самки на протяжении всей жизни. Такие записи позволяют выделять животных, которые одновременно характеризуются высокой плодовитостью и длительным сохранением репродуктивной функции.

В экспериментальную выборку настоящей работы вошли восемь самок соболя из АО «Племенной зверосовхоз «Салтыковский» и АО «Русский соболь», отобранных на основании многолетних индивидуальных данных о воспроизводстве. Самки характеризовались высокой плодовитостью и длительным сохранением репродуктивной функции, включая размножение в позднем возрасте. Подробная характеристика животных и критерии формирования исследуемых групп представлены в подразделе 2.3.1, Таблице 2.

При этом репродуктивные показатели соболя являются комплексным фенотипом и зависят от целого ряда факторов. Показано, что репродуктивные показатели связаны не только с возрастом самки и самца, но и взаимодействием возрастных характеристик обоих партнеров [52]. Помимо физиологических факторов, на репродуктивные показатели могут влиять поведенческие особенности и реакция на стресс, что дополнительно подчеркивает сложную многофакторную природу данного признака [50]. Также была исследована возможная связь воспроизводства с фенотипом окраски. Полученные результаты остаются противоречивыми: в разных выборках были описаны как отсутствие связи между окраской и плодовитостью, так и различия в репродуктивных показателях отдельных цветовых групп [51,53–60]. Эти данные показывают, что единичный репродуктивный показатель не может быть рассмотрен как непосредственное

отражение генотипа и что для поиска генетических факторов особенно важны многолетние индивидуальные данные о воспроизводстве.

Генетические исследования репродуктивных признаков непосредственно у соболя немногочисленны. В одной из ранних работ была оценена связь уровня генетической гетерозиготности, определенной по аллозимным маркерам, с возрастом первого размножения, продолжительностью жизни и плодовитостью у звероводческой популяции соболя. Анализ был проведен на основе вариабельности восьми полиморфных аллозимных локусов. Слабая ассоциация была обнаружена только для возраста первого размножения [61].

Данные о генетических механизмах, связанных с репродуктивными признаками, были получены преимущественно для американской норки (*Neogale vison*, син. *Neovison vison*), одного из наиболее изученных представителей семейства куньих. Многолетние исследования в звероводческих популяциях показали, что размер помета имеет наследуемую составляющую, оцененную примерно в 14 %, и изменяется под действием направленного отбора. Так, в эксперименте по направленному отбору американской норки в течение пяти поколений средний размер помета в селекционной линии оказался на 43 % выше, чем в контрольной (5,3 против 3,7 детеныша) [62]. Генетическая основа репродуктивных признаков у американской норки была показана при анализе наследуемости таких показателей, как размер помета, выживаемость потомства и продолжительность беременности [63]. Развитие геномных технологий позволило перейти от оценки наследуемости к непосредственному поиску геномных вариантов, связанных с воспроизводством у куньих. При исследовании более двухсот американских норок были обнаружены геномные регионы, ассоциированные с общим числом рожденных и числом живорожденных детенышей. Среди кандидатов для размера помета были предложены гены *SLC26A36, STXBP5L* и *RPS29*, а для числа живорожденных – гены *FSCB, PDPN, NKX2-1, NFKB1, NFKBIA* и *GABBR1* [64]. Эти результаты не означают, что те же гены определяют плодовитость соболя, однако они демонстрируют возможность обнаружения конкретных геномных локусов, связанных с количественными репродуктивными признаками у представителей куньих.

Таким образом, несмотря на наличие данных о возрастной динамике воспроизводства соболя и наследуемости отдельных репродуктивных признаков у куньих, генетические механизмы, определяющие различия между особями по длительности сохранения репродуктивной функции и сочетанию высокой плодовитости с продолжительным репродуктивным периодом, остаются практически неизученными. Изучение внутривидовой вариабельности этих признаков представляет собой важное направление для понимания генетических основ репродуктивного долголетия.

1.3. Отложенная имплантация как репродуктивная стратегия куньих (Mustelidae)

Одной из характерных особенностей репродуктивной биологии многих куньих, включая соболя, является отложенная имплантация. Формирование этой репродуктивной стратегии тесно связано с сезонностью размножения. Для видов умеренных и высоких широт время рождения потомства имеет критическое значение, поскольку доступность кормовых ресурсов, температура и продолжительность благоприятного периода существенно изменяются в течение года. В этих условиях естественный отбор может способствовать формированию механизмов, позволяющих регулировать сроки эмбрионального развития и рождения потомства. Одной из таких репродуктивных стратегий является эмбриональная диапауза – обратимое замедление или временная приостановка развития эмбриона, обычно на стадии бластоцисты. У плацентарных млекопитающих эмбриональная диапауза, как правило, сопровождается задержкой имплантации бластоцисты и реализуется в форме отложенной имплантации. Таким образом, эмбриональная диапауза характеризует состояние и динамику развития эмбриона, тогда как отложенная имплантация отражает изменение сроков его взаимодействия с эндометрием [65,66].

Эмбриональная диапауза является широко распространенной репродуктивной стратегией, описанной у более чем 130 видов плацентарных и сумчатых млекопитающих. Она встречается в нескольких отрядах и характеризуется значительным разнообразием форм, различающихся по продолжительности задержки развития, степени зависимости от внешних условий и механизмам регуляции диапаузы [67] (Рисунок 2).

	 Мышь	 Косуля	 Норка	 Валлаби
Число эмбрионов	6–12	1–4	2–12	1
Тип диапаузы	факультативная	облигатная	облигатная	факультативная или облигатная
Длительность диапаузы	до ~40 дней	4–5 месяцев	2 недели	11 месяцев
Длительность беременности после имплантации	16 дней	4–5 месяцев	31 день	9 дней
Рост в период диапаузы	первые 5 дней	непрерывно	пролиферация отсутствует	пролиферация отсутствует
Число клеток эмбриона (начало-конец диапаузы)	140–200 клеток	100–20 тыс. клеток	250–500 клеток	80 клеток
Морфология эмбриона	Удлинённая бластоциста без блестящей оболочки	Бластоциста лимоновидной формы без блестящей оболочки	Бластоциста в блестящей оболочке	Бластоциста в блестящей оболочке, муциновом слое и скорлуповой оболочке

Рисунок 2 – Сравнительная характеристика эмбриональной диапаузы у разных видов млекопитающих (адаптировано из [67])

Выделяют факультативную и облигатную формы эмбриональной диапаузы. При факультативной форме задержка развития возникает в ответ на физиологическое состояние самки, например, при лактации, тогда как облигатная форма является частью нормального репродуктивного цикла и обычно связана с сезонностью размножения [65,68]. Особый интерес в контексте изучения репродуктивного долголетия представляет связь эмбриональной диапаузы с продолжительностью жизни. Thom et al. [69] показали, что среди семейства куньих виды с большей продолжительностью жизни чаще характеризуются наличием эмбриональной диапаузы даже после учета филогенетического родства. Это позволяет предположить связь эмбриональной диапаузы с особенностями жизненного цикла долгоживущих видов, однако само по себе не свидетельствует о том, что диапауза увеличивает продолжительность жизни. Среди хищных облигатная отложенная имплантация особенно характерна для куньих, что делает это семейство удобной сравнительной моделью для изучения эволюции данного репродуктивного признака [70,71].

Особый интерес представляет неоднородное распределение отложенной имплантации внутри самого семейства куньих. У ряда видов она является обязательной частью каждого репродуктивного цикла, тогда как у других близкородственных видов имплантация происходит без задержки. Продолжительность эмбриональной диапаузы также существенно различается между видами: у американской норки задержка относительно непродолжительна, около двух недель, тогда как у некоторых других куньих она может продолжаться многие месяцы [69,71]. Таким образом, куньи представляют семейство, в котором близкородственные виды демонстрируют выраженные различия по данному репродуктивному признаку.

Эволюционное происхождение отложенной имплантации у хищных обсуждается в нескольких сравнительных исследованиях. Филогенетические реконструкции указывали на ее древнее происхождение с последующими неоднократными изменениями состояния признака, особенно внутри куньих [69,72]. При этом современное распределение отложенной имплантации невозможно объяснить исключительно филогенетическим родством. После учета филогении ее наличие у куньих оказалось связано с экологическими и жизненно-историческими характеристиками, включая широту распространения, сезонность среды, продолжительность жизни, размер тела и характеристики репродуктивных затрат [69,72,73]. Сезонность рассматривается как один из основных факторов, способствовавших сохранению этой репродуктивной стратегии. Сравнение 34 видов куньих показало, что среди взаимосвязанных климатических характеристик именно выраженность сезонности наиболее хорошо объясняла наличие или утрату отложенной имплантации [73]. Предполагается, что задержка имплантации

позволяет совместить оптимальное время спаривания с оптимальным временем рождения потомства даже в тех случаях, когда эти периоды разделены интервалом, превышающим обычную продолжительность беременности. Тем самым сроки спаривания и последующего активного эмбрионального развития оказываются разделены во времени, а рождение потомства происходит в наиболее благоприятный период года. Вместе с тем связь признака с размером тела, долголетием и материнскими инвестициями показывает, что его эволюция определяется не одним экологическим фактором, а сочетанием сезонных условий и особенностей жизненного цикла [69,73].

На физиологическом уровне отложенная имплантация наиболее подробно изучена у американской норки. После оплодотворения эмбрион проходит ранние стадии дробления и достигает стадии бластоцисты, после чего его развитие временно приостанавливается. В период диапаузы снижаются клеточная пролиферация и метаболическая активность, при этом бластоциста сохраняет жизнеспособность и способность возобновить развитие после поступления соответствующих сигналов от организма самки [65,70]. Принципиально важно, что это состояние является обратимым: реактивация сопровождается возобновлением роста бластоцисты, изменением состояния эндометрия и последующей имплантацией (Рисунок 3).

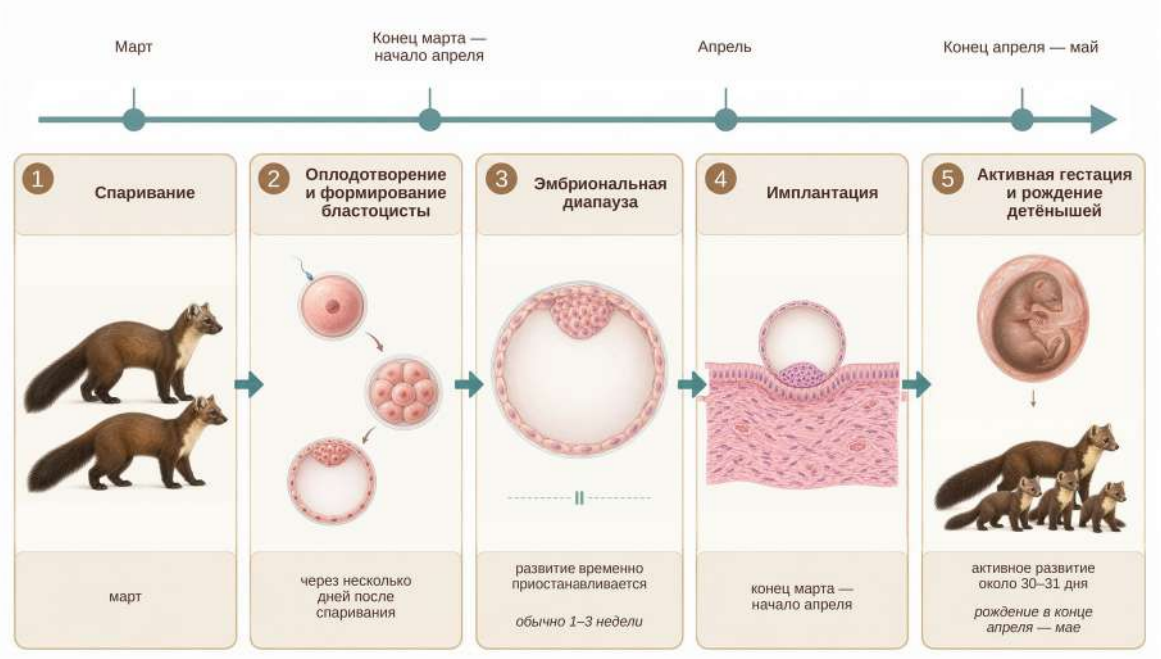


Рисунок 3 – Основные этапы отложенной имплантации у американской норки (*Neovison vison*)

Молекулярные изменения при отложенной имплантации затрагивают и саму бластоцисту. После реактивации у норки существенно усиливается синтез ДНК и белка и возобновляется пролиферация клеток трофобласта и внутренней клеточной массы [74]. Исследование факторов, потенциально регулирующих состояние задержки, выявило в бластоцистах норки активные ядерные формы *FOXO1, FOXO3* и *FOXO4,* а также экспрессию *CDKN1A*, что указывает на

возможное участие этих факторов в поддержании эмбриональной диапаузы [70]. Таким образом, период задержки и последующей реактивации сопровождается изменениями молекулярных механизмов, регулирующих клеточный цикл и развитие эмбриона.

У норки сроки реактивации тесно связаны с фотопериодом. Увеличение продолжительности светового дня весной изменяет мелатониновый сигнал, формируемый эпифизом, и приводит к повышению секреции пролактина. Экспериментальные изменения фотопериода и функции эпифиза показали, что именно эта система передает информацию о сезонных изменениях к репродуктивной системе [75,76]. Пролактин, в свою очередь, стимулирует реактивацию желтого тела и увеличение продукции прогестерона, совпадающие по времени с возобновлением развития бластоцисты и последующей имплантацией [70,77,78].

Экспериментальные данные непосредственно подтверждают центральную роль пролактина в этой системе. Введение пролактина норкам во время периода эмбриональной диапаузы ускоряло активацию желтого тела и имплантацию, тогда как подавление секреции пролактина приводило к противоположному эффекту и увеличивало продолжительность беременности [77]. Вместе с тем действие пролактина не ограничивается стимуляцией синтеза стероидных гормонов в яичнике. Современные исследования показывают, что он одновременно воздействует на матку и формирует условия, необходимые для выхода эмбриона из состояния задержки развития [70,79].

Изменения, сопровождающие реактивацию развития бластоцисты, выявлены также на уровне экспрессии генов яичника. Транскриптомный анализ американской норки выявил 655 дифференциально экспрессирующихся генов при сравнении периода эмбриональной диапаузы с состоянием после реактивации развития бластоцисты. Изменения затрагивали пути синтеза стероидных гормонов, метаболические процессы и регуляцию кальциевого обмена. Среди генов, для которых были подтверждены изменения экспрессии, присутствовали гены, участвующие в сигнальном пути пролактина и формировании функционально активного желтого тела [80]. Эти результаты свидетельствуют об изменении молекулярных процессов в яичнике при реактивации развития эмбриона.

Наряду с изменениями в яичнике, важную роль в поддержании диапаузы и реактивации эмбриона играет состояние матки. Решающая роль материнской среды была показана еще в экспериментах по переносу эмбрионов между норкой и хорьком, а позднее подтверждена исследованиями культуры бластоцист. Эти работы продемонстрировали, что способность эмбриона продолжить развитие во многом определяется состоянием матки, а не необратимыми изменениями самого эмбриона. Культивирование бластоцист норки совместно с эндометриальными клетками увеличивало их выживаемость и в отдельных случаях способствовало возобновлению роста [70,81]. Следовательно, поддержание и прекращение

отложенной имплантации связано с изменением состава сигналов, поступающих от эндометрия к эмбриону. Одним из наиболее подробно охарактеризованных молекулярных механизмов этой регуляции является обмен полиаминов. В период задержки развития в матке норки снижена экспрессия ряда генов, участвующих в синтезе полиаминов, включая *ODC1*, кодирующий орнитиндекарбоксилазу – ключевой фермент синтеза путресцина. Пролактин стимулирует экспрессию *ODC1* в эндометрии через сигнальные механизмы, включающие STAT1 и mTOR. Экспериментальное подавление синтеза полиаминов вызывает обратимую остановку развития эмбриона, тогда как добавление путресцина к бластоцистам *in vitro* способствует возобновлению их роста и клеточной пролиферации [79]. Эти данные связывают сезонный эндокринный сигнал непосредственно с изменением маточной среды и реактивацией эмбриона.

Другим фактором, связанным с переходом к имплантации, является LIF. У норки его экспрессия в матке практически не определяется во время эмбриональной диапаузы, возрастает непосредственно перед имплантацией и локализуется преимущественно в железистом эпителии эндометрия [82]. Такой профиль соответствует предполагаемой роли LIF как одного из ключевых факторов, участвующих в формировании восприимчивого состояния эндометрия и начале имплантации.

Состояние матки во время отложенной имплантации связано также с регуляцией генов семейства *MSX*. Сравнительное исследование мыши, норки и таммар-валлаби показало, что различные физиологические механизмы задержки развития сходятся на поддержании экспрессии генов *MSX* в матке. У норки *MSX1* интенсивно экспрессируется в люминальном и железистом эпителии в период задержки и быстро снижается после реактивации бластоцисты. На мышиной модели показано, что белки MSX могут регулировать экспрессию гена *Wnt5a*, что указывает на возможную роль этого механизма в поддержании временно невосприимчивого состояния матки [83].

Транскриптомные исследования существенно расширили представления о молекулярных изменениях, сопровождающих реактивацию. При сравнении матки норки в период эмбриональной диапаузы и после активации развития бластоцисты были выявлены многочисленные дифференциально экспрессирующиеся гены, связанные с межклеточной передачей сигналов, внеклеточным матриксом и клеточной адгезией. Среди обогащенных сигнальных путей можно выделить путь фосфатидилинозитол-3-киназы–протеинкиназы B, взаимодействие компонентов внеклеточного матрикса с рецепторами и регуляцию межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий; среди центральных генов транскриптомной сети были представлены *VEGFA, EGF, AKT, IGF1, PIK3C* и *CCND1* [84]. Эти данные показывают, что реактивация развития бластоцисты представляет собой не переключение единственного сигнального пути, а согласованную перестройку состояния

эндометрия, включающую клеточную пролиферацию, адгезию, ремоделирование тканей и взаимодействие матки с бластоцистой.

В совокупности молекулярно-генетические исследования отложенной имплантации выявили изменения экспрессии генов и сигнальных путей в бластоцисте, яичнике и матке, связанные с поддержанием задержки развития и последующей реактивацией эмбриона. Однако среди куньих большинство таких исследований выполнено на американской норке и основано на сравнении различных стадий репродуктивного цикла. Эти работы позволяют охарактеризовать молекулярные процессы, происходящие при отложенной имплантации, но не позволяют определить геномные изменения, связанные с эволюцией этого репродуктивного признака у куньих.

1.4. Генетические причины нарушений созревания ооцита, оплодотворения и раннего эмбрионального развития

Наряду с эволюционными особенностями репродуктивных стратегий важное значение имеет изучение генетических причин нарушений женской репродуктивной функции. Женская репродуктивная функция обеспечивается согласованным взаимодействием нейроэндокринной системы, яичников, матки и половых клеток. Генетические нарушения могут затрагивать нейроэндокринную регуляцию, развитие и функцию яичников, стероидогенез, созревание ооцитов, состояние эндометрия, оплодотворение и раннее эмбриональное развитие. В зависимости от того, какой из этих процессов нарушен, клинические проявления могут существенно различаться и включать снижение фертильности или бесплодие [85] (Рисунок 4).

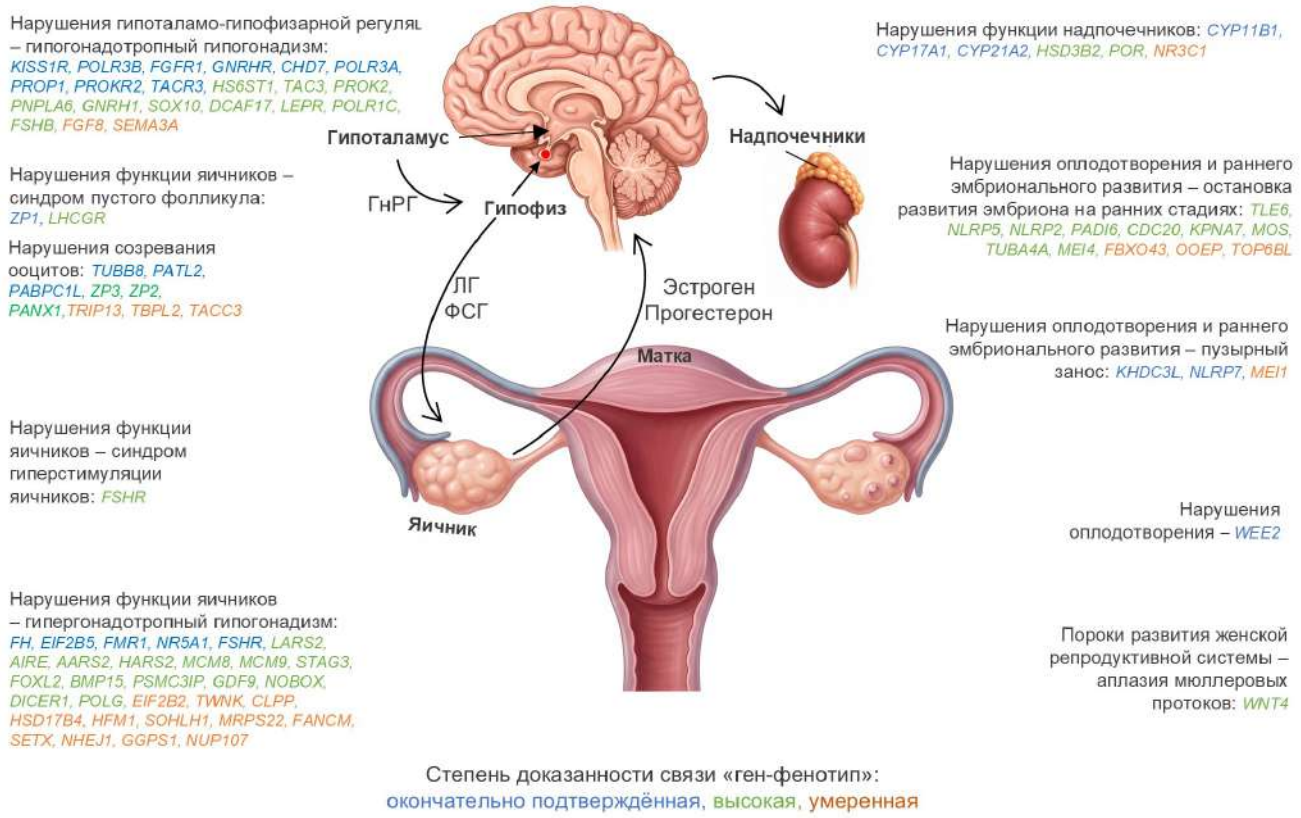


Рисунок 4 – Генетически обусловленные нарушения женской репродуктивной функции на различных уровнях репродуктивной системы (адаптировано из [85])

Значительная часть генетически обусловленных нарушений связана непосредственно с ооцитом, поскольку его нормальное созревание, структурная организация и способность к оплодотворению необходимы для последующего развития эмбриона. Возрастное снижение женской репродуктивной функции также связано не только с уменьшением овариального резерва, но и с ухудшением качества ооцитов, включая снижение их способности к нормальному оплодотворению и раннему эмбриональному развитию [86,87]. Созревание ооцита представляет собой последовательный процесс, в ходе которого клетка приобретает способность к оплодотворению и дальнейшему обеспечению раннего развития эмбриона. В растущем фолликуле ооцит длительное время сохраняется в профазе I мейоза на стадии зародышевого пузырька. По мере созревания фолликула мейоз возобновляется, происходит разрушение зародышевого пузырька, формируется веретено первого мейотического деления и ооцит переходит в метафазу I. После завершения первого мейотического деления и отделения первого полярного тельца ооцит вступает во второе мейотическое деление, которое приостанавливается на стадии метафазы II и завершается только после оплодотворения. Одновременно с ядерным созреванием происходят изменения цитоплазмы, включающие накопление и перераспределение материнских РНК, белков и органелл, необходимых для оплодотворения и первых этапов развития эмбриона.

В процессе роста ооцита формируется блестящая оболочка, обеспечивающая его взаимодействие со сперматозоидом. Нарушение любого из этих этапов может приводить к снижению или полной утрате способности ооцита к оплодотворению. В одних случаях мейоз не возобновляется и ооциты сохраняются на стадии зародышевого пузырька, в других происходит остановка в метафазе I вследствие нарушений формирования мейотического веретена или расхождения хромосом. Возможны также дефекты уже зрелых ооцитов, достигших метафазы II, при которых нарушается их активация после проникновения сперматозоида или завершение второго мейотического деления. Наряду с этим генетические нарушения могут изменять строение блестящей оболочки, морфологию ооцита и его способность обеспечивать раннее эмбриональное развитие [88–94].

На генетическую природу нарушения может указывать повторное возникновение сходного фенотипа у одной и той же пациентки в нескольких циклах вспомогательных репродуктивных технологий при отсутствии эндокринных и анатомических причин. К настоящему времени установлено, что генетические нарушения могут затрагивать различные молекулярные процессы, обеспечивающие созревание и функционирование ооцита. В зависимости от функции соответствующих генов такие нарушения можно условно разделить на несколько основных групп, включающих дефекты организации мейотического веретена и расхождения хромосом, нарушения регуляции материнских РНК и трансляционной активности ооцита, дефекты активации ооцита после оплодотворения, нарушения функционирования субкортикального материнского комплекса и изменения структуры блестящей оболочки [95] (Таблица 1).

Таблица 1 – Основные группы генов, участвующих в регуляции созревания ооцита, оплодотворения и раннего эмбрионального развития (адаптировано из [95])

Группа нарушений	Основные гены	Основные биологические процессы
Нарушения созревания ооцита и прохождения мейоза	*TUBB8, PATL2, CDC20, TRIP13, REC114, CHEK1*	Формирование мейотического веретена, контроль клеточного цикла, расхождение хромосом
Нарушения цитоплазматической организации ооцита и регуляции материнских факторов	*PABPC1L, TBPL2, BTG4, PADI6*	Организация цитоплазмы ооцита, регуляция материнских РНК и белков, обеспечение раннего эмбрионального развития
Нарушения формирования и функций блестящей оболочки	*ZP1, ZP2, ZP3, ZP4*	Формирование внеклеточного матрикса ооцита, взаимодействие со сперматозоидом, предотвращение полиспермии
Нарушения активации ооцита после оплодотворения	*WEE2, CDC20*	Завершение мейоза II, переход от зрелого ооцита к зиготе
Нарушения раннего эмбрионального развития и материнского контроля	*TLE6, NLRP5, NLRP2, NLRP7, OOEP, KHDC3L*	Функционирование субкортикального материнского комплекса, первые деления эмбриона, переход к эмбриональной транскрипции

Одной из наиболее изученных групп являются гены, связанные с нарушением созревания ооцита и прохождения мейоза. Их продукты участвуют в различных процессах, необходимых для созревания ооцита, включая организацию мейотического веретена, регуляцию клеточного цикла и контроль экспрессии материнских РНК. Нарушение этих процессов может приводить к остановке созревания ооцитов на различных стадиях мейоза, включая стадии зародышевого пузырька (GV), метафазы I (MI) и метафазы II (MII). К данной группе относятся *TUBB8, PATL2, CDC20* и *TRIP13*. Так, *TUBB8* кодирует ооцит-специфический β-тубулин, являющийся структурным компонентом микротрубочек мейотического веретена. Патогенные варианты этого гена нарушают динамику микротрубочек и могут приводить к различным вариантам остановки созревания ооцитов. *CDC20* участвует в регуляции перехода от метафазы к анафазе через активацию комплекса APC/C, а *TRIP13* обеспечивает функционирование контрольной точки сборки веретена деления и корректное расхождение хромосом [88,96–98].

Формирование зрелого ооцита также включает приобретение цитоплазматической компетентности, необходимой для поддержания раннего эмбрионального развития. В период роста ооцита происходит накопление материнских РНК, белков и регуляторных факторов, которые используются после оплодотворения до момента активации собственного генома эмбриона. Нарушения этих процессов связаны с изменениями генов, регулирующих стабильность материнских транскриптов, их трансляцию и формирование функционально полноценной цитоплазмы ооцита. К данной группе относятся *PABPC1L, TBPL2, BTG4* и *PADI6*. Белок PABPC1L участвует в регуляции материнских РНК, необходимых для созревания ооцита и ранних этапов эмбриогенеза, тогда как BTG4 обеспечивает деградацию материнских транскриптов после оплодотворения и участвует в переходе от материнского контроля к эмбриональной транскрипции. Нарушения *PADI6* связаны с изменением структуры цитоплазматических компонентов ооцита и остановкой развития эмбриона на ранних стадиях [99–101].

Отдельную группу составляют нарушения формирования и функций блестящей оболочки (*zona pellucida*) – специализированного внеклеточного матрикса ооцита, состоящего преимущественно из гликопротеинов *ZP1-ZP4.* Эти белки обеспечивают структурную организацию оболочки, взаимодействие со сперматозоидом, предотвращение полиспермии и поддержание нормального развития раннего эмбриона. Генетические варианты в генах семейства *ZP* могут приводить к изменению структуры отдельных доменов белков, нарушению сборки блестящей оболочки и снижению способности ооцита к оплодотворению [96,102,103].

После проникновения сперматозоида зрелый ооцит должен пройти активацию и завершить второе мейотическое деление, что является необходимым условием формирования полноценной зиготы. Нарушения данного этапа могут возникать при изменении генов,

регулирующих завершение мейоза II и переход к эмбриональному развитию. Одним из наиболее изученных генов этой группы является *WEE2*, кодирующий ооцит-специфический регулятор клеточного цикла. Патогенные варианты *WEE2* ассоциированы с нарушением завершения второго мейотического деления после оплодотворения и могут приводить к отсутствию активации ооцита и нарушению формирования зиготы [104].

Последующие стадии развития эмбриона зависят от материнских факторов, накопленных в ооците, и способности эмбриона перейти от регуляции материнскими факторами к собственной программе развития. Важную роль в этом процессе играет субкортикальный материнский комплекс, включающий белки, кодируемые генами *TLE6, NLRP5, NLRP2, NLRP7, OOEP* и *KHDC3L*. Компоненты субкортикального материнского комплекса участвуют в организации цитоскелета, регуляции первых клеточных делений и поддержании развития эмбриона до активации его собственного генома. Нарушения этих генов могут приводить к остановке развития зиготы или эмбриона на ранних стадиях и являются одной из основных причин дефектов материнского контроля раннего эмбриогенеза [95,96,105].

Изучение генов, регулирующих созревание и функциональное состояние ооцита, имеет значение не только для понимания причин нарушения репродукции, но и для исследования молекулярных механизмов возрастного снижения фертильности. Поскольку сохранение функциональной активности ооцита является одним из ключевых условий поддержания репродуктивной способности, данные гены представляют интерес при изучении факторов, определяющих продолжительность сохранения репродуктивного потенциала [86].

Таким образом, генетически обусловленные нарушения функций ооцита представляют собой гетерогенную группу состояний, при которых могут быть затронуты различные этапы репродуктивного процесса – от прохождения мейоза и формирования зрелого ооцита до его активации после оплодотворения и поддержания раннего эмбрионального развития. Несмотря на различия в функциях отдельных генов, объединяющим признаком этих нарушений является снижение способности ооцита обеспечивать успешное оплодотворение и дальнейшее развитие эмбриона.

1.5. Пострепродуктивное долголетие у зубатых китов (Odontoceti)

Сохранение способности ооцита к нормальному созреванию, оплодотворению и поддержанию раннего эмбрионального развития является необходимым условием сохранения репродуктивной функции самки. Вместе с тем сроки возрастного снижения репродуктивной

функции и общего старения организма могут различаться. Возрастное угасание репродуктивной функции может завершаться необратимым прекращением овуляции – менопаузой. Однако продолжительность жизни после прекращения размножения существенно различается между видами. У большинства млекопитающих этот период относительно непродолжителен, тогда как у некоторых видов значительная часть жизни самки приходится на период после завершения репродукции. В этом случае говорят о продолжительном пострепродуктивном периоде. Для количественной оценки последнего используется, в частности, показатель пострепродуктивной представленности (postreproductive representation, PrR), отражающий долю лет взрослой жизни самок в популяции, приходящуюся на период после завершения размножения ($PrR = T_M/T_B$, где T_M – ожидаемое число лет пострепродуктивной жизни, T_B – ожидаемое число лет взрослой жизни) [11,106].

Продолжительный пострепродуктивный период в природных популяциях млекопитающих встречается редко. Для человека и нескольких видов зубатых китов представлены убедительные доказательства наличия такого периода, который сочетается с необратимым прекращением репродуктивной функции. Вместе с тем признаки продолжительного пострепродуктивного периода описаны также у азиатского слона и шимпанзе, однако интерпретация этих случаев менее однозначна [9,107].

У азиатских слонов отсутствует четкая возрастная граница полного прекращения репродукции. Отдельные самки продолжают размножаться после 60 лет, а снижение плодовитости происходит постепенно. Поэтому принято считать, что наблюдаемый пострепродуктивный период может быть обусловлен не безвозвратной утратой физиологической возможности репродукции, а возрастными изменениями состояния животных, особенностями спаривания и другими демографическими факторами [108,109].

Другой интересный пример был получен для диких шимпанзе сообщества Нгого в Уганде. У самок этой популяции пострепродуктивная представленность составила 0,195, то есть достигшие взрослого возраста самки в среднем могли проживать около одной пятой взрослой жизни после завершения размножения. Демографические данные были дополнены гормональными признаками угасания функции яичников, включая повышение концентраций гонадотропинов у старых самок. Вместе с тем такой фенотип пока не считается типичным для шимпанзе в целом, поскольку в большинстве других изученных природных популяций самки редко доживают до возраста, при котором возникает длительный пострепродуктивный период [110]. Более того, анализ 2025 года показал, что у шимпанзе Нгого возрастные изменения родства внутри социальных подгрупп создают условия, при которых прекращение размножения примерно после 40 лет может снижать межпоколенческий репродуктивный конфликт [111] (Рисунок 5).

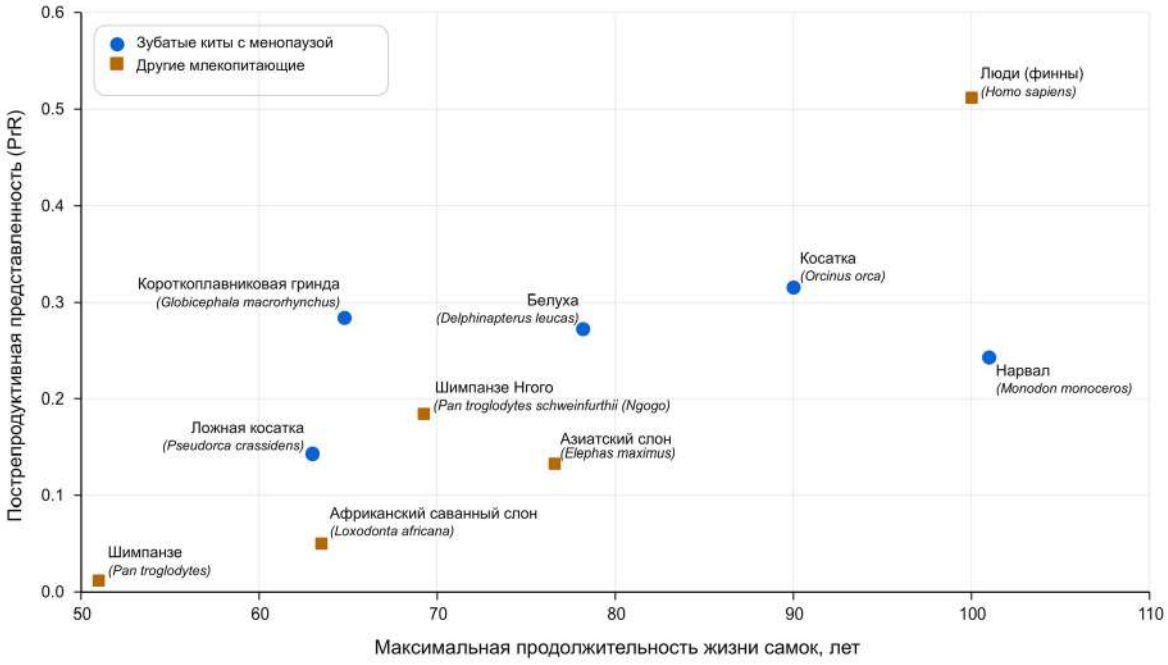


Рисунок 5 – Пострепродуктивная представленность и максимальная продолжительность жизни самок у млекопитающих (адаптировано из [112])

Данные по азиатскому слону и шимпанзе показывают, что продолжительный период жизни после прекращения размножения не во всех случаях сопровождается четко установленным физиологическим прекращением репродуктивной функции на уровне вида [108–110]. У азиатского слона снижение плодовитости происходит постепенно [108,109], а у шимпанзе убедительные демографические и эндокринные данные пока получены для одной необычно долгоживущей природной популяции [110]. В отличие от этих случаев, у нескольких видов зубатых китов продолжительный пострепродуктивный период подтверждается совокупностью демографических и физиологических данных [9,11,113]. У китообразных имеются дополнительные возможности для ретроспективной оценки репродуктивной истории. После овуляции фолликул последовательно преобразуется в желтое, а затем в белое тело, которые у многих китообразных длительно сохраняются в яичнике. Поэтому их количество позволяет оценивать возрастную динамику активности яичников. Сравнительный анализ таких данных у зубатых китов показал, что у нескольких видов репродуктивное старение опережает соматическое старение, что приводит к формированию продолжительного периода жизни после завершения размножения. Значительная физиологическая пострепродуктивная представленность была установлена для белухи, нарвала и короткоплавниковой гринды и составляла соответственно около 0,27, 0,24 и 0,15 [9]. Для ложной косатки ранее также были получены морфологические и демографические свидетельства наличия пострепродуктивного

периода. У половины обследованных самок старше 45 лет овуляция уже прекратилась, а все самки старше 55 лет были отнесены к пострепродуктивным [113].

В совокупности современные данные свидетельствуют о наличии менопаузы и продолжительного пострепродуктивного периода у пяти видов зубатых китов – косатки (*Orcinus orca*), короткоплавниковой гринды (*Globicephala macrorhynchus*), ложной косатки (*Pseudorca crassidens*), белухи (*Delphinapterus leucas*) и нарвала (*Monodon monoceros*). Филогенетический анализ указывает на неоднократное возникновение данного признака в эволюции зубатых китов, что принципиально отличает эту группу от большинства других млекопитающих и позволяет исследовать повторяющиеся условия формирования пострепродуктивного долголетия [9,11].

Сравнительный демографический анализ зубатых китов позволил проверить несколько конкурирующих объяснений происхождения этого фенотипа. Согласно гипотезе раннего прекращения размножения, пострепродуктивный период должен формироваться за счет сокращения репродуктивной продолжительности жизни. Альтернативная гипотеза предполагает сохранение приблизительно той же продолжительности репродуктивного периода при увеличении общей продолжительности жизни. Анализ Ellis et al. показал [11], что наблюдаемые закономерности согласуются со вторым сценарием. Виды зубатых китов с менопаузой живут в среднем примерно на 40 ± 5 лет дольше, чем сопоставимые по размеру виды без менопаузы, тогда как их репродуктивный период не является соответственно укороченным. Таким образом, продолжительный пострепродуктивный период сформировался преимущественно за счет эволюционного увеличения соматической продолжительности жизни после завершения репродукции.

Само увеличение продолжительности жизни, однако, не объясняет, каким образом может поддерживаться отбор на выживание после прекращения собственного размножения. Основные адаптивные модели связывают это с изменением непрямой приспособленности самки. У косаток присутствие матери повышает выживаемость взрослых потомков, особенно сыновей [114]. Пострепродуктивные самки также чаще возглавляют перемещения группы в местах кормления, причем их лидерская роль возрастает в годы низкой численности лосося. Эти результаты рассматриваются как свидетельство передачи старшими самками накопленной экологической информации родственникам [115].

Преимущества распространяются не только на непосредственное потомство. У косаток наличие бабушки связано с повышенной выживаемостью внуков, причем эффект наиболее заметен для пострепродуктивных бабушек [116]. Длительный пострепродуктивный период при этом был обнаружен в генетически и экологически различающихся популяциях косаток. У двух экологически различающихся экотипов косаток: резидентного (R-типа) и экотипа Бигга, более 30 % взрослой жизни самок приходится на период после завершения размножения [117].

Второй важный механизм связан с межпоколенческим репродуктивным конфликтом. У косаток R-типа при одновременном размножении матери и ее взрослой дочери риск гибели детеныша старшей самки был примерно в 1,7 раза выше, чем детеныша молодой самки. При увеличении родства самки с членами собственной социальной группы с возрастом продолжение размножения становится для старшей самки все менее выгодным, тогда как помощь уже имеющимся потомкам и внукам может обеспечивать непрямой вклад в приспособленность [10].

Особенно показательным сравнением служит длинноплавниковая гринда (*Globicephala melas*), у которой продолжительный пострепродуктивный период отсутствует, несмотря на социальную структуру и возможность помощи потомству. Молодые самки этого вида чаще имели потомство при присутствии собственной матери, что указывает на преимущества межпоколенческой помощи. Однако признаков существенного репродуктивного конфликта между одновременно размножающимися матерями и дочерьми обнаружено не было. Следовательно, одной пользы от присутствия старших самок недостаточно для формирования продолжительного пострепродуктивного периода, если продолжение их собственного размножения не связано со значительными издержками [118].

Таким образом, имеющиеся данные указывают, что формирование продолжительного пострепродуктивного периода у зубатых китов связано не с одним фактором, а с сочетанием нескольких эволюционных предпосылок. К ним относятся увеличение продолжительности жизни, возможность повышения приспособленности родственников за счет помощи старших самок и снижение издержек, связанных с межпоколенческим репродуктивным конфликтом [11] (Рисунок 6).

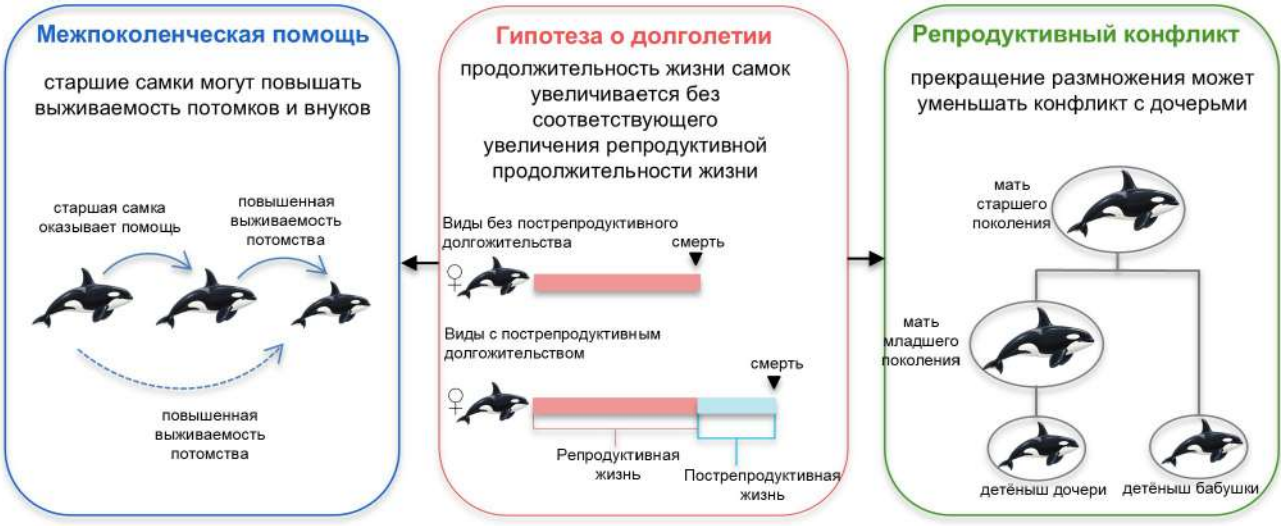


Рисунок 6 – Увеличение продолжительности жизни, связанное с удлинением пострепродуктивного периода, может иметь адаптивное значение благодаря возможности

оказания межпоколенной помощи и/или снижению репродуктивного конфликта между поколениями

Несмотря на существенный прогресс в понимании демографических и социальных предпосылок пострепродуктивного долголетия у зубатых китов, молекулярно-генетические механизмы формирования данного фенотипа остаются практически не изученными. Сравнительные геномные исследования китообразных были преимущественно направлены на изучение адаптаций к водной среде, особенностей эхолокации, размеров тела, устойчивости к онкологическим заболеваниям и других признаков, связанных с эволюцией данной группы [41,119,120]. При этом геномные изменения, сопровождавшие независимое возникновение продолжительного пострепродуктивного периода у филогенетически удаленных видов зубатых китов, до настоящего времени систематически не исследовались.

1.6. Интегративные подходы к анализу генетических факторов сложных фенотипов

Генетическая основа сложных репродуктивных фенотипов, как правило, включает множество генов, участвующих в различных биологических процессах и молекулярных путях. При этом сходные функциональные изменения могут формироваться за счет изменений разных генов и геномных участков. Поэтому интерпретация результатов геномных исследований требует их сопоставления не только на уровне отдельных генов, но и на уровне биологических процессов и молекулярных путей. Современные геномные исследования позволяют получать данные о различных типах генетических изменений, однако интерпретация результатов отдельных анализов не всегда позволяет установить, какие молекулярные механизмы лежат в основе изучаемого признака. Для решения подобных задач применяют интегративные подходы, объединяющие результаты сравнительной геномики, анализа генетических вариантов, транскриптомики и функциональной аннотации [121,122].

Необходимость такого подхода особенно наглядно проявляется при исследовании эволюционной конвергенции. Формирование сходных фенотипов в независимых филогенетических линиях не обязательно сопровождается возникновением идентичных генетических изменений. В одних случаях изменения затрагивают разные участки одного ортологичного гена или его регуляторные элементы, в других – различные гены, участвующие в одном молекулярном пути. В связи с этим конвергенция может проявляться на нескольких уровнях, от отдельных генов до общих молекулярных путей. Характер генетической конвергенции при этом может зависеть от сложности исследуемого признака и эволюционной

удаленности сравниваемых видов [123,124]. Примером конвергенции на функциональном уровне служат независимые переходы животных к наземному образу жизни. Сравнительно-геномный анализ представителей различных филогенетических линий с привлечением транскриптомных и протеомных данных показал, что генетическая основа адаптации к наземной среде существенно различалась между линиями. В частности, при исследовании ответов на абиотические стрессовые факторы было установлено, что разные виды характеризовались преимущественно различными наборами генов, которые, однако, имели сходную функциональную принадлежность. Полученные результаты свидетельствуют о возможности функциональной конвергенции при различиях в генетических изменениях, сопровождающих независимые адаптивные процессы [125,126]. Подобная закономерность наблюдается и при исследовании генетических факторов сложных признаков человека. При сопоставлении генов, связанных с распространенными и редкими генетическими вариантами, для 373 признаков было установлено, что, несмотря на ограниченное совпадение отдельных генов, более чем для 75 % исследованных признаков они были объединены общими молекулярными сетями. Степень выявленного функционального сходства была связана с наследуемостью признака, ограничениями генетической изменчивости и тканевой специфичностью [127]. Таким образом, прямое пересечение списков генов не всегда позволяет в полной мере оценить функциональную общность результатов независимых исследований, для установления которой необходимо учитывать функциональные связи между выявленными генами.

Для сопоставления результатов на функциональном уровне используют референсные базы данных, содержащие сведения о функциях генов и их участии в биологических процессах. В частности, онтология генов (Gene Ontology, GO) обеспечивает систематизированную аннотацию биологических процессов, молекулярных функций и клеточных компонентов, тогда как Киотская энциклопедия генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) и база данных биологических путей Reactome содержат сведения о молекулярных и сигнальных путях, биохимических реакциях и взаимодействиях между их компонентами [128]. На основе этих данных проводят анализ функционального обогащения, позволяющий определить, представлены ли гены определенного процесса или пути в исследуемом наборе чаще, чем ожидается при случайном выборе генов из заданного фонового множества [128].

Вместе с тем результаты анализа функционального обогащения зависят от размера исследуемого набора генов, числа генов, относящихся к соответствующему пути, и состава фонового множества. На статистическую значимость также влияют пересечение генов между функциональными категориями и поправка на множественное тестирование. В результате даже небольшое изменение числа совпадающих генов может повлиять на вывод о наличии статистически значимого обогащения [128,129].

Эти ограничения приобретают особое значение при сопоставлении результатов независимых геномных исследований, различающихся по числу выявленных генов и используемым методам анализа. В таких случаях анализ на уровне отдельных генов может быть дополнен их функциональным сопоставлением на уровне биологических процессов и молекулярных путей. Такой подход позволяет выявлять сходство между независимыми наборами генов даже при ограниченном совпадении отдельных генов [127,130].

1.7. Заключение по обзору литературы

Анализ имеющихся данных показывает, что возрастная динамика репродуктивной функции существенно различается как между видами млекопитающих, так и между отдельными особями одного вида. У одних животных способность к размножению сохраняется до поздних этапов жизни, тогда как у других ее снижение начинается значительно раньше окончания жизни [8,18]. Особый случай представляет продолжительный пострепродуктивный период, при котором прекращение размножения значительно предшествует окончанию жизни [11].

Механизмы возрастного снижения репродуктивной функции наиболее подробно изучены у человека и лабораторных животных. Старение репродуктивной системы сопровождается истощением овариального резерва, снижением качества ооцитов, нарушениями мейоза, накоплением повреждений ДНК, изменениями энергетического обмена и другими клеточными и молекулярными изменениями [19,20,24]. Генетические исследования возраста естественной менопаузы у человека также указывают на важную роль репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и поддержания стабильности генома [15,31]. При этом генетические факторы, связанные с длительным сохранением репродуктивной функции, изучены значительно меньше.

Особенно ограничены данные о геномных изменениях, связанных с межвидовыми различиями в продолжительности репродуктивного периода. Несмотря на накопленные сведения о генетических основах долголетия и отдельных признаков репродуктивного жизненного цикла [33,39], геномные изменения, непосредственно связанные с длительным сохранением репродуктивной функции у филогенетически удаленных плацентарных млекопитающих, остаются недостаточно изученными. Для изучения генетической основы индивидуальных различий внутри вида необходимы внутривидовые исследования. В частности, генетические особенности самок соболя, сочетающих высокую плодовитость с длительным сохранением репродуктивной функции, практически не изучены.

Отдельное направление исследований связано с эволюционно сформированными репродуктивными стратегиями. Для отложенной имплантации у куньих достаточно подробно охарактеризованы физиологические процессы и изменения экспрессии генов, сопровождающие поддержание диапаузы и последующую реактивацию бластоцисты. Однако эти исследования преимущественно характеризуют молекулярные процессы, происходящие при реализации данного признака [68,70,80,84]. Вместе с тем геномные изменения, связанные с эволюцией отложенной имплантации у куньих, остаются недостаточно изученными. Несмотря на выявление отдельных кандидатных генов в сравнительно-геномных исследованиях [131], систематический анализ эволюционно ускоренных консервативных геномных регионов в связи с наличием данного признака ранее не проводился. Различия в наличии и продолжительности отложенной имплантации между видами этой группы позволяют использовать сравнительно-геномный подход для поиска таких изменений.

Важным источником информации о молекулярных механизмах репродуктивной функции служат также исследования наследственных нарушений созревания и функционирования ооцита. Известны гены, изменения которых приводят к нарушениям мейоза, формирования блестящей оболочки, оплодотворения и раннего эмбрионального развития [95,96]. Изучение таких нарушений позволяет определить молекулярные процессы, необходимые для нормального созревания и функционирования ооцита, и использовать эти данные для функциональной интерпретации генов, связанных с репродуктивным долголетием.

Недостаточно изучены молекулярно-генетические механизмы пострепродуктивного долголетия. Для зубатых китов подробно исследованы демографические и социальные факторы, связанные с продолжительной жизнью после прекращения размножения, а также показано независимое возникновение продолжительного пострепродуктивного периода в нескольких эволюционных линиях. Вместе с тем сравнительно-геномный анализ пострепродуктивного долголетия ранее не проводился, и геномные изменения, связанные с его независимым возникновением, остаются неизученными.

Таким образом, исследования длительного сохранения репродуктивной функции, отдельных репродуктивных стратегий, нарушений функционирования ооцита и пострепродуктивного долголетия проводились преимущественно независимо друг от друга. Их сопоставление позволяет рассматривать молекулярно-генетические факторы, связанные с сохранением, регуляцией и нарушением репродуктивной функции, а также с пострепродуктивным долголетием, и искать общие механизмы, объединяющие эти процессы и признаки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общий дизайн исследования

В соответствии с поставленными задачами исследование проводили по пяти основным направлениям (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Общий дизайн исследования молекулярно-генетических механизмов репродуктивного и пострепродуктивного долголетия у млекопитающих

Первое направление было посвящено исследованию длительного сохранения репродуктивной функции у представителей отрядов приматов, хищных и китопарнокопытных. Сравнительно-геномный анализ проводили путем сопоставления видов, различающихся по возрастной динамике репродуктивной функции. Второе направление включало полногеномный анализ самок соболя с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью в сравнении с контрольными группами. Третье направление было посвящено исследованию регуляции сроков репродуктивного процесса на примере отложенной имплантации. Представителей семейства куньих с отложенной имплантацией сравнивали с видами отряда хищных без данного фенотипа. В четвертом направлении исследовали пострепродуктивное долголетие путем сравнительно-геномного анализа видов зубатых китов с продолжительным пострепродуктивным периодом и видов, для которых наличие такого периода не установлено. Пятое направление было посвящено изучению генетических факторов репродуктивных нарушений и включало молекулярно-генетический анализ клинических случаев нарушения созревания ооцитов и формирования

блестящей оболочки у человека. На заключительном этапе проводили интегративный анализ результатов сравнительно-геномных и популяционно-геномных исследований для выявления общих генов, биологических процессов и молекулярных путей.

2.2. Сравнительно-геномный анализ эволюционно ускоренных регионов

Для исследования эволюционных изменений генома, связанных с различными репродуктивными фенотипами, использовали единую схему сравнительно-геномного анализа. Исходными данными служило множественное выравнивание 470 геномов млекопитающих UCSC Genome Browser, представленное в формате MAF в координатах референсной сборки генома человека GRCh38/hg38 [132]. В соответствии с рассматриваемым фенотипом виды разделяли на исследуемую и фоновую группы. Фенотипическую классификацию видов проводили на основании опубликованных исследований возрастных изменений репродуктивных показателей, преимущественно полученных при наблюдении за природными популяциями. Для каждого анализа использовали данные видов, включенных в соответствующие исследуемую и фоновую группы. На основании множественного геномного выравнивания видов фоновой группы определяли консервативные геномные элементы, после чего оценивали ускорение их эволюции у исследуемых видов. Полученные наборы эволюционно ускоренных регионов сопоставляли между видами и проводили их геномную и функциональную аннотацию. Полный состав исследуемых и фоновых групп, сведения о геномных сборках, идентификаторы последовательностей в составе выравнивания и критерии классификации представлены в приложении А.

2.2.1. Виды плацентарных млекопитающих с различной выраженностью репродуктивного старения

Для исследования длительного сохранения репродуктивной функции сравнивали виды плацентарных млекопитающих с поздним началом или слабо выраженными признаками репродуктивного старения и виды с выраженным возрастным снижением репродуктивной функции. При формировании групп использовали данные популяционных и лонгитюдных исследований возрастной динамики репродуктивных показателей самок, обобщенные в работе Lemaître и соавт. (2020), а также результаты аналогичных исследований других видов

млекопитающих. В исследуемую группу включили белолобого капуцина (*Cebus capucinus imitator*) [8,133], белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus*) [8,134], полосатого мангуста (*Mungos mungo*) [8,9], пятнистую гиену (*Crocuta crocuta*) [8,135], северного морского слона (*Mirounga angustirostris*) [136,137] и финвала (*Balaenoptera physalus*) [8,138], характеризующихся длительным сохранением репродуктивной функции или относительно поздним либо слабо выраженным ее снижением с возрастом. Фоновую группу составили макак-резус (*Macaca mulatta*) [139,140], северный олень (*Rangifer tarandus*) [8,141], сурикат (*Suricata suricatta*) [8,142], лев (*Panthera leo*) [9,143], серый тюлень (*Halichoerus grypus*) [144], дикая морская свинка (*Cavia aperea*) [145], индийская афалина (*Tursiops aduncus*) [8,146] и человек (*Homo sapiens*) [9,147], характеризующиеся выраженным возрастным снижением репродуктивной функции (Приложение А, Таблица А.1).

2.2.2. Виды отряда Хищные с различными особенностями регуляции сроков репродуктивного процесса

Для исследования особенностей регуляции сроков репродуктивного процесса сравнивали виды отряда Хищные с отложенной имплантацией и без нее. При формировании групп использовали опубликованные данные о распространении отложенной имплантации у представителей данного отряда, в том числе семейства Куньи [69,72,148]. При отборе видов с отложенной имплантацией дополнительно учитывали качество геномных сборок, используя пороговое значение N50 скаффолдов не менее 1 Мб. В исследуемую группу включили пять представителей семейства Куньи с отложенной имплантацией: соболя (*Martes zibellina*), канадскую выдру (*Lontra canadensis*), северного калана (*Enhydra lutris kenyoni*), горностая (*Mustela erminea*) и американскую норку (*Neovison vison*). Фоновую группу составили четыре представителя семейства Куньи: гигантская выдра (*Pteronura brasiliensis*), речная выдра (*Lutra lutra*), лесной хорек (*Mustela putorius*) и домашний хорек (*Mustela putorius furo*), а также 32 других представителя отряда Хищные (Carnivora), у которых отложенная имплантация отсутствует (Приложение А, Таблица А.2; Приложение Б, Рисунок Б.1).

2.2.3. Представители парвотряда Зубатые киты с различной продолжительностью пострепродуктивного периода

Для исследования пострепродуктивного долголетия сравнивали представителей парвотряда Зубатые киты с продолжительным пострепродуктивным периодом и виды, у которых наличие такого периода не установлено. При формировании групп использовали данные исследования Ellis и соавт. (2024), в котором продолжительность репродуктивного и пострепродуктивного периодов у самок оценивали на основании демографических данных, в том числе с использованием показателя пострепродуктивной представленности (см. Раздел 1.5) [11]. В исследуемую группу включили три вида зубатых китов с документированным продолжительным пострепродуктивным периодом: косатку (*Orcinus orca*), нарвала (*Monodon monoceros*) и белуху (*Delphinapterus leucas*). Фоновую группу составили шесть видов зубатых китов, у которых продолжительный пострепродуктивный период не был установлен: длинноплавниковая гринда (*Globicephala melas*), дынеголовый дельфин (*Peponocephala electra*), тихоокеанский белобокий дельфин (*Lagenorhynchus obliquidens*), индийская афалина (*Tursiops aduncus*), обыкновенная морская свинья (*Phocoena phocoena*) и карликовый кашалот (*Kogia breviceps*) (Таблица А.3).

2.2.4. Филогенетическая характеристика исследуемых видов

Для характеристики филогенетических отношений между исследуемыми видами использовали опубликованные филогенетические данные. Для видов плацентарных млекопитающих с различной выраженностью репродуктивного старения использовали данные TimeTree 5 [149], для представителей отряда Хищные – филогенетическое дерево млекопитающих Upham и соавт. [150], а для зубатых китов – филогеномное дерево китообразных McGowen и соавт. [118].

Для каждого направления сравнительно-геномного анализа из соответствующего филогенетического дерева выделяли поддерево, включавшее виды исследуемой и фоновой групп, с сохранением топологии и длин ветвей. Обработку деревьев выполняли с использованием библиотеки Biopython [151], визуализацию – в программе FigTree v1.4.4 [152].

2.2.5. Выявление общих эволюционно ускоренных геномных регионов

Для трех сравнительно-геномных исследований исходными данными служило множественное выравнивание 470 геномов млекопитающих UCSC Genome Browser, построенное относительно референсной сборки генома человека GRCh38/hg38 [132]. Для каждого анализа из исходного выравнивания формировали подвыравнивание, включавшее виды соответствующих исследуемой и фоновой групп. Координаты консервативных геномных элементов и эволюционно ускоренных регионов указывали относительно референсной сборки GRCh38/hg38.

Консервативные геномные элементы выявляли по последовательностям фоновых видов с помощью программы phastCons, входящей в пакет PHAST версии 1.6 [153,154]. Использовали следующие параметры: ожидаемая длина консервативного элемента – 45 п. н., ожидаемая доля позиций, относимых к консервативным элементам – 0,3 и значение параметра относительной скорости нуклеотидных замен $\rho = 0{,}31$. Параметры выбирали в соответствии с ранее опубликованными сравнительно-геномными исследованиями ускоренной эволюции консервативных элементов у млекопитающих [41,45]. В дальнейшую обработку включали элементы длиной не менее 50 п. н.

Скорость нуклеотидных замен оценивали отдельно для каждого исследуемого вида с использованием RPHAST версии 1.6.9 [154,155]. Ускорение эволюции оценивали относительно ожидаемой скорости нуклеотидных замен, рассчитанной на основе филогенетической модели с учетом родственных связей видов и длин ветвей дерева. Для каждого элемента или фрагмента с помощью теста отношения правдоподобий сравнивали нулевую модель, не предполагающую ускорения в соответствующей ветви, с альтернативной моделью, допускающей повышенную скорость нуклеотидных замен. Статистическую значимость оценивали на основании эмпирического распределения тестовой статистики при нулевой гипотезе, сформированного по результатам 5000 случайных выравниваний. На его основе рассчитывали односторонние эмпирические значения *p*. Поправку на множественное тестирование проводили методом Бенджамини–Хохберга [163]; эволюционно ускоренными считали регионы при FDR ≤ 5 % (Рисунок 8).

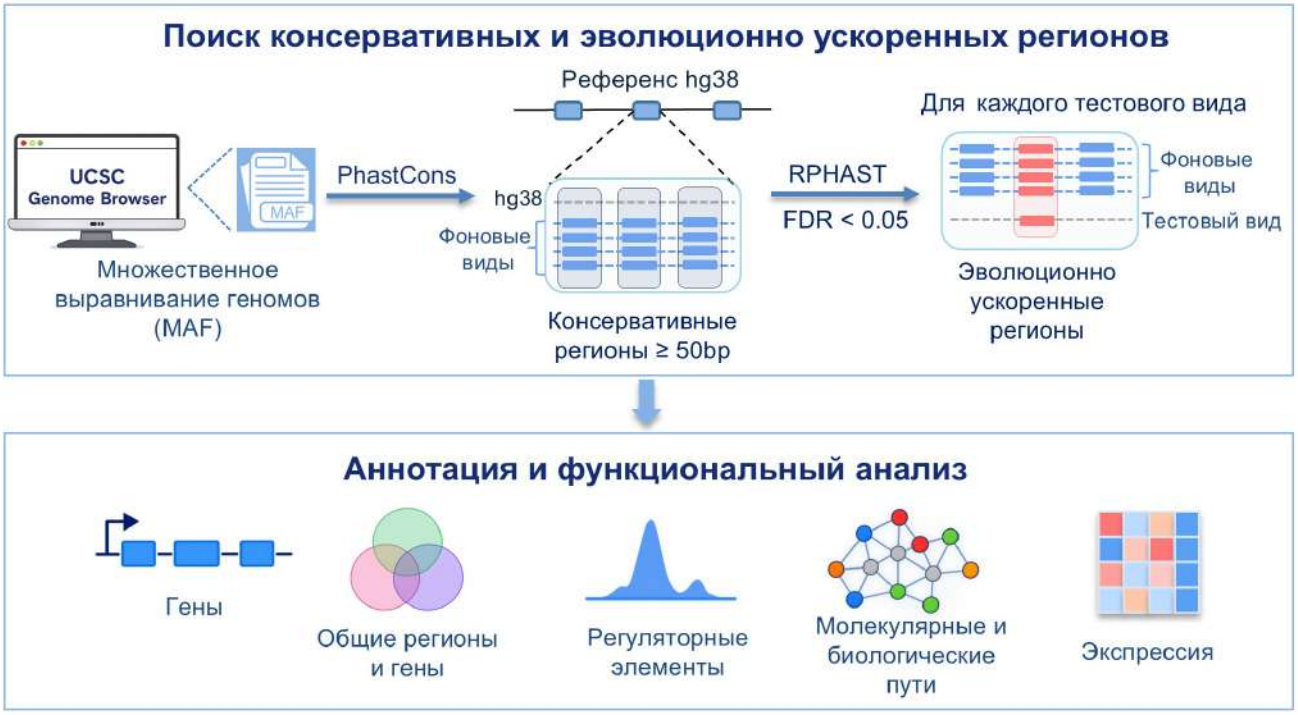


Рисунок 8 – Дизайн сравнительно-геномного анализа для идентификации эволюционно ускоренных регионов и их функциональной характеристики

Для оценки возможного влияния фрагментированности геномных сборок и филогенетической структуры выборки на результаты выявления ЭУР анализировали связь доли ЭУР среди протестированных геномных окон со значениями N50 скаффолдов и филогенетическим расстоянием до ближайшего фонового вида. Для каждого исследуемого вида долю ЭУР рассчитывали как отношение числа выявленных ЭУР к общему числу протестированных окон. Зависимости оценивали методом линейной регрессии с использованием функции lm в R (версия 4.1.3) [156]. Значения N50 предварительно логарифмировали по основанию 10. Филогенетические расстояния рассчитывали как минимальные суммы длин ветвей между исследуемым и фоновыми видами на дереве UCSC hg38 470-way, построенном на основе четырехкратно вырожденных сайтов (4D-сайтов) [132]. Для шести основных регрессионных моделей p-значения коэффициентов наклона корректировали методом Бенджамини-Хохберга.

Распределение ЭУР по аутосомам оценивали отдельно для каждого исследуемого вида. Для каждой хромосомы определяли число выявленных ЭУР и общее число консервативных элементов, протестированных на эволюционное ускорение. Ожидаемое число ЭУР рассчитывали пропорционально числу протестированных элементов на соответствующей хромосоме. Статистическую значимость отклонений наблюдаемого числа ЭУР от ожидаемого оценивали с помощью гипергеометрического теста с поправкой Бенджамини–Хохберга.

Выявленные у отдельных видов эволюционно ускоренные регионы (ЭУР) сопоставляли по координатам ортологичных элементов. При исследовании длительного сохранения репродуктивной функции и отложенной имплантации отбирали регионы, ускоренные не менее чем у трех из шести и трех из пяти видов соответственно. При исследовании пострепродуктивного долголетия отбирали регионы, ускоренные у всех трех исследуемых видов зубатых китов.

Статистическую значимость числа общих эволюционно ускоренных регионов оценивали с помощью перестановочного теста, реализованного на языке Python с использованием библиотеки NumPy [157]. При каждой из 1 000 000 перестановок ЭУР каждого исследуемого вида случайным образом распределяли между анализируемыми консервативными геномными элементами с сохранением исходного числа ЭУР для каждого вида. Для каждой перестановки определяли число регионов, удовлетворяющих критерию общности, установленному для соответствующего сравнительно-геномного анализа. Эмпирическое p-значение (p_{perm}) рассчитывали по формуле $p = (k + 1)/(B + 1)$, где k – число перестановок, при которых количество общих ЭУР было не меньше наблюдаемого, а B – общее число перестановок [158].

Для дополнительного сравнения исследуемых геномных регионов рассчитывали долю нуклеотидных отличий ортологичных последовательностей от консенсусной последовательности внешней группы. Для сравниваемых групп рассчитывали средние значения нуклеотидной дивергенции с использованием Python (версия 3.11) [159]. Межгрупповые различия оценивали односторонним парным критерием знаковых рангов Уилкоксона [160], реализованным в библиотеке SciPy (версия 1.15.0) [161]. Аналогичный анализ проводили для контрольного набора консервативных геномных регионов. Для дополнительного контроля качества общих ЭУР их координаты в референсном геноме человека GRCh38/hg38 сопоставляли с аннотациями сегментных дупликаций UCSC Genome Browser [132] и проблемных геномных областей ENCODE blacklist [162]. Регионы, перекрывающиеся с указанными областями, исключали из дальнейшего анализа.

2.2.6. Геномная аннотация эволюционно ускоренных регионов и определение связанных с ними генов

Для определения положения ускоренных регионов относительно генов использовали сведения о координатах белок-кодирующих генов, экзонов и кодирующих последовательностей (CDS) из базы Ensembl версии 115 для референсной сборки GRCh38 [163]. Перекрытие

ускоренных регионов с указанными участками определяли по геномным координатам с помощью команды bedtools intersect пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164].

Для некодирующих ускоренных регионов возможную связь с генами определяли с помощью инструмента GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool, версия 4.0.4) [165]. Использовали модель *basal plus extension*. Для каждого гена задавали базовый регуляторный домен, включавший 5 тыс. п. н. перед и 1 тыс. п. н. после сайта начала транскрипции независимо от расположения соседних генов. Затем регуляторный домен расширяли в обоих направлениях до границы базового домена ближайшего гена, но не более чем на 1 млн п. н. в каждом направлении. Дополнительно во всех исследованиях определяли общие гены, в которых ЭУР были выявлены у всех видов соответствующей исследуемой группы.

Использование двух подходов к определению генов, связанных с ЭУР, обусловлено особенностями организации генома млекопитающих. Непосредственное перекрытие ускоренных регионов с генами позволяет определить, какие гены содержат участки с измененной скоростью нуклеотидных замен. При этом ускоренная эволюция может затрагивать как кодирующие последовательности, так и интронные области генов. Однако значительная часть функционально значимых последовательностей генома расположена за пределами генов и может участвовать в регуляции их экспрессии.

Использование инструмента GREAT позволяет дополнительно учитывать геномные регионы, расположенные на значительном расстоянии от сайтов начала транскрипции. В отличие от непосредственного пересечения геномных координат, данный подход основан на определении предполагаемой регуляторной области гена. Таким образом, один и тот же ускоренный регион может быть связан с несколькими генами, а с одним геном могут быть связаны несколько ускоренных регионов.

Сопоставление результатов на уровне генов имеет особое значение при сравнении филогенетически удаленных видов. Изменения, потенциально влияющие на функционирование одного и того же гена, могут затрагивать различные участки его последовательности или регуляторной области. В связи с этим отсутствие совпадения координат ЭУР у разных видов не исключает наличия изменений в пределах общих геномных локусов.

Вместе с тем определение генов с использованием предполагаемых регуляторных доменов носит предсказательный характер. Расположение ЭУР в пределах такого домена не свидетельствует непосредственно о его регуляторной активности или влиянии на экспрессию соответствующего гена. Поэтому результаты геномной аннотации использовали прежде всего для формирования наборов генов-кандидатов и их дальнейшей функциональной характеристики.

Для оценки обогащения регуляторных доменов генов ЭУР с учетом числа доступных для тестирования участков для каждого вида проводили дополнительный статистический анализ. В

качестве общего фона использовали все 50-п.н. участки, для которых проводилось тестирование на эволюционное ускорение. Для каждого гена определяли число тестируемых участков, входящих в его регуляторный домен по инструменту GREAT [165], и число ЭУР среди них. Ожидаемое число ЭУР рассчитывали с учетом общего числа тестируемых участков и общей доли ЭУР у соответствующего вида. Значимость превышения наблюдаемого числа ЭУР над ожидаемым оценивали с использованием одностороннего гипергеометрического теста. Поправку на множественные сравнения проводили методом Бенджамини-Хохберга отдельно для каждого вида. Обогащение ЭУР считали статистически значимым при FDR < 0,05.

2.2.7. Сопоставление эволюционно ускоренных регионов с регуляторными и эпигеномными данными

2.2.7.1. Определение перекрытия эволюционно ускоренных регионов с регуляторными элементами и участками хроматина по данным генома человека

Для характеристики возможной регуляторной роли ускоренных регионов использовали данные о кандидатных цис-регуляторных элементах (ЦРЭ) из реестра ENCODE Registry of candidate cis-Regulatory Elements (cCREs, версия 4) для сборки GRCh38 [166]. Ортологичные участки генома человека, соответствующие ускоренным регионам, сопоставляли с указанными элементами. Перекрытие определяли по геномным координатам с помощью команды bedtools intersect пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164]. Учитывали следующие классы кандидатных цис-регуляторных элементов (candidate cis-regulatory elements, cCRE): элементы с промотороподобной сигнатурой (promoter-like signature, PLS), проксимальные и дистальные элементы с энхансероподобной сигнатурой (proximal and distal enhancer-like signatures, pELS и dELS), элементы доступного хроматина (chromatin accessibility, CA) и элементы доступного хроматина с сайтами связывания CCCTC-связывающего фактора CTCF (CA-CTCF).

Данные о доступности хроматина, связывании транскрипционных факторов и модификациях гистонов в различных тканях и типах клеток получали из ChIP-Atlas (версия 3.0) [167] – базы данных, объединяющей и стандартизирующей результаты публичных экспериментов иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq) и других методов профилирования хроматина. Анализировали данные секвенирования участков, гиперчувствительных к ДНКазе I (DNase-seq), а также данные иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq) о связывании транскрипционных факторов и

модификациях гистонов. С помощью инструмента анализа обогащения (Enrichment Analysis) платформы ChIP-Atlas оценивали обогащение исследуемых наборов ускоренных регионов участками доступного хроматина, сайтами связывания транскрипционных факторов и участками с различными модификациями гистонов. В качестве фонового набора использовали случайные геномные участки, полученные путем 100 перестановок исходного набора регионов. Статистически значимыми считали результаты при $q < 0,05$. Для отдельных экспериментов дополнительно использовали координаты пиков обогащения, выявленных методом иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq), с порогом значимости $q < 1 \times 10^{-5}$.

2.2.7.2. Перекрытие эволюционно ускоренных регионов зубатых китов с участками, обогащенными H3K4me3 и H3K27ac, в печени дельфина рода Delphinus

При исследовании пострепродуктивного долголетия зубатых китов дополнительно использовали опубликованные данные ChIP-seq о распределении модификаций гистонов H3K4me3 и H3K27ac в печени дельфина рода *Delphinus* [168]. Участки, обогащенные H3K4me3, рассматривали как потенциальные промоторные области, а участки, обогащенные H3K27ac и не перекрывающиеся с H3K4me3 – как потенциальные энхансерные области.

Исходные координаты указанных участков, определенные относительно сборки генома афалины (*Tursiops truncatus,* turTru1), переводили в координаты референсной сборки генома человека GRCh38/hg38 с помощью программы CrossMap (версия 0.7.3) [169], используя данные парного выравнивания геномов афалины и человека. В дальнейший анализ включали участки, для которых в выравнивании было представлено не менее 50 % исходной последовательности.

Перекрытие полученных участков с эволюционно ускоренными регионами исследуемых видов зубатых китов определяли по геномным координатам с помощью команды bedtools intersect пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164].

2.2.7.3. Перекрытие эволюционно ускоренных регионов куньих с участками, обогащенными H3K4me3, во фронтальной коре американской норки

Для оценки возможной регуляторной роли эволюционно ускоренных регионов, связанных с отложенной имплантацией, использовали ранее полученные нашей лабораторией данные ChIP-

seq, характеризующие распределение модификации гистона H3K4me3 во фронтальной коре шести американских норок (*Neogale vison*), по три животных агрессивной и ручной линий [170].

Прочтения картировали на сборку генома американской норки (Neovison_vison.NNQGG.v01) с помощью программы BWA (версия 0.7.17) [171]. Полученные файлы сортировали и маркировали дубликаты прочтений с помощью SAMtools (версия 1.9) [172]. Участки генома, обогащенные H3K4me3, выявляли отдельно для каждого образца с помощью MACS2 (версия 2.2.7.1) [173]. С использованием пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164] формировали объединенный набор участков, выявленных хотя бы в одном из шести образцов. Для определения перекрытия с эволюционно ускоренными регионами из множественного выравнивания 470 геномов млекопитающих UCSC извлекали соответствующие им ортологичные участки генома американской норки с помощью инструмента maf_parse, входящего в пакет PHAST версии 1.5 [154]. Координаты ортологичных участков определяли относительно этой же сборки генома. Перекрытие полученных участков с объединенным набором участков, обогащенных H3K4me3, определяли по геномным координатам с помощью команды bedtools intersect пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164].

2.2.8. Функциональный анализ и сопоставление с данными об экспрессии генов

2.2.8.1. Анализ функционального обогащения

Анализ функционального обогащения исследуемых наборов генов выполняли с использованием g:Profiler, модуля g:GOSt [174]. Рассматривали категории Gene Ontology (GO): «Биологические процессы» (Biological Process), «Молекулярные функции» (Molecular Function) и «Клеточные компоненты» (Cellular Component), а также биологические пути KEGG. Статистическую значимость определяли с помощью гипергеометрического теста с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественное тестирование, значимыми считали результаты при FDR < 5 %.

Для сокращения числа близких по смыслу терминов GO результаты для категории «Биологические процессы» дополнительно обрабатывали с помощью REVIGO (версия 1.8.2) [175]. В качестве референсного вида использовали *Homo sapiens*, для оценки семантического сходства – меру SimRel, порог сходства составлял 0,5.

2.2.8.2. Оценка тканевой специфичности экспрессии генов

Обогащение исследуемых наборов генами с тканеспецифичной экспрессией оценивали с помощью пакета TissueEnrich [176] с использованием данных Human Protein Atlas [177]. В фоновый набор включали гены, для которых в Human Protein Atlas имелись данные об экспрессии в тканях. Статистическую значимость обогащения определяли с помощью гипергеометрического теста с последующей поправкой Бенджамини–Хохберга на множественное тестирование. Значимыми считали результаты при FDR < 5 %.

2.2.8.3. Сопоставление с транскриптомными данными американской норки

Для дополнительного анализа генов, связанных с эволюционно ускоренными регионами у куньих с отложенной имплантацией, их сопоставляли с опубликованными данными RNA-seq матки американской норки в период эмбриональной диапаузы и после реактивации бластоцисты, полученными Cao и соавт. [84], а также с данными RNA-seq яичников американской норки в соответствующие периоды, опубликованными Fan и соавт. [80].

Наборы генов, полученные при непосредственном перекрытии ЭУР с генами и при определении регуляторных доменов (см. подраздел 2.2.6), сопоставляли с опубликованными списками ДЭГ. Пересечение списков генов осуществляли по символам генов. Для совпадающих генов учитывали направление изменения экспрессии и приведенные в исходных исследованиях значения $\log_2$FC и скорректированного p.

2.2.9. Анализ изменений сайтов связывания транскрипционных факторов

Для эволюционно ускоренных регионов, общих для косатки, белухи и нарвала, оценивали возможные изменения сайтов связывания транскрипционных факторов. Ортологичные последовательности исследуемых и фоновых видов извлекали из множественного выравнивания 470 геномов млекопитающих базы данных UCSC Genome Browser по координатам референсной сборки генома человека GRCh38/hg38. Потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов предсказывали на основе позиционно-весовых матриц. Использовали 879 матриц из базы данных JASPAR (версия 2024), коллекции CORE для позвоночных [178] и 1443 матрицы из

базы данных HOCOMOCO (версия 12), коллекции CORE [179]. Поиск соответствий позиционно-весовым матрицам в обеих цепях ДНК выполняли с помощью программы MOODS (версия 1.9.4) [180] при пороговом значении $p \leq 1 \times 10^{-4}$, псевдосчете 0,25 и равных фоновых частотах нуклеотидов.

Наличие или отсутствие предсказанного сайта у исследуемых видов оценивали относительно шести фоновых видов зубатых китов. Для каждого мотива за фоновое состояние принимали его наличие или отсутствие не менее чем у четырех из шести фоновых видов. Появлением потенциального сайта считали его отсутствие не менее чем у четырех фоновых видов и наличие у соответствующего исследуемого вида, а утратой – его наличие не менее чем у четырех фоновых видов и отсутствие у соответствующего исследуемого вида. В дальнейший анализ включали только изменения одного типа, наблюдавшиеся у всех трех исследуемых видов. Идентичные изменения, выявленные для одного и того же ускоренного региона и одного и того же транскрипционного фактора по матрицам из баз данных JASPAR и HOCOMOCO учитывали как одно событие [178,179].

Для оценки изменений, не охватывающих одновременно все три вида, дополнительно рассматривали попарные сравнения как в общих ЭУР, так и в регионах, совпадающих по координатам у двух исследуемых видов. Для графического представления нуклеотидных мотивов использовали библиотеку Logomaker (версия 0.8.7) [181]. Высоту нуклеотидных символов рассчитывали с учетом вероятностей оснований и информационного содержания каждой позиции в битах [182]. Визуализацию выравниваний последовательностей и графиков оценок соответствия мотивам с указанием пороговых значений выполняли с помощью Matplotlib (версия 3.10.5) [183] в среде Python (версия 3.11.13) с использованием библиотек NumPy (версия 2.1.0) [157] и pandas (версия 2.3.1) [184].

2.3. Полногеномный и популяционно-генетический анализ соболей с различной продолжительностью репродуктивного периода и плодовитостью

2.3.1. Характеристика выборки и формирование исследуемых групп

В исследование были включены 53 особи соболя (*Martes zibellina*), в том числе 32 самки и 21 самец. Выборка состояла из 21 животного из зверохозяйств и 32 особей из природных популяций (Приложение Г, Таблица Г.1).

Исследуемую группу составили восемь фермерских самок, отобранных на основании многолетних индивидуальных данных о воспроизводстве. Эти животные характеризовались высокой плодовитостью и длительным сохранением репродуктивной функции (Таблица 2). Четыре самки происходили из племенного зверосовхоза «Салтыковский» Московской области, четыре – из зверохозяйства «Русский соболь». Контрольную фермерскую группу составили семь самок из зверохозяйства «Русский соболь», при включении которых в исследование не проводили специального отбора по признакам высокой плодовитости и длительного сохранения репродуктивной функции. Для сравнительного анализа фермерских и диких соболей в выборку также включили шесть фермерских самцов.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика репродуктивных показателей у разных групп соболей

Параметр	Дикие самки	Фермерские самки	Самки с длительным сохранением высокой репродуктивной продуктивности
Возраст первого размножения	15-27 месяцев [185,186]	24-36 месяцев [187]	15-16 месяцев
Параметр	Дикие самки	Фермерские самки	Самки с длительным сохранением высокой репродуктивной продуктивности
Средний размер помета	2,5-3,5 [48,50,188]	~3,5 щенка [189]	~4 щенка
Процент размножающихся однолеток	20-90 %** [50]	Покрывается: 20-60 %; Приплод: <20% [50,51]	37,5 %
Процент пропустов у молодых самок	Нет данных	~80 % [51]	50 %
Пик плодовитости (возраст)	Нет данных	6-10 лет [48,49]	5-12 лет
Процент самок, размножающихся после 8 лет	<5 % [48,190]	>30 % [50,191]	>60 %
Продолжительность репродуктивного периода	4-7 лет* [48]	до 12-14 лет [48,51]	8-19 лет
Продолжительность жизни	Средняя: 6-8 лет, максимальная: 18 лет *** [189,190]	Средняя: 8-10 лет****, максимальная: до 22 лет [48,191]	8-19 лет****

* Данные основаны на подсчете желтых тел и иллюстрируют потенциальный показатель

** Региональный разброс

** Большинство особей гибнет от внешних причин до наступления старости

**** С учетом выбраковки в хозяйствах

В выборку из природных популяций вошли 32 особи из различных регионов России, включая Сихотэ-Алинь, Тигильский район Камчатки, Омскую область, район поселка Тура на Среднесибирском плоскогорье, Невельский район острова Сахалин, остров Итуруп, Улаганский район Республики Алтай, район поселка Келлог, бассейн реки Подкаменная Тунгуска, восточный Урал и Окинский район Республики Бурятия. Выборка включала 17 самок и 15 самцов. Географическое происхождение исследованных особей из природных популяций представлено в приложении Г (Таблица Г.1, Рисунок Г.1).

Полногеномное секвенирование восьми самок с длительным сохранением высокой репродуктивной продуктивности было выполнено в рамках настоящего исследования. Для остальных 45 особей использовали ранее полученные данные полногеномного секвенирования, описанные в работе А. Д. Манахова [192].

Для поиска генетических факторов, связанных с длительным сохранением репродуктивной функции, восемь самок исследуемой группы сравнивали с семью контрольными фермерскими самками. Дополнительное сравнение проводили с 17 самками из природных популяций. Полную выборку из 53 особей использовали для популяционно-генетического анализа.

2.3.2. Выделение геномной ДНК и полногеномное секвенирование

Геномную ДНК выделяли с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Геномные библиотеки готовили с использованием набора TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, США). Количественную оценку полученных библиотек проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием набора KAPA Library Quantification Kit (Roche, Швейцария). Секвенирование геномных библиотек проводили на платформе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США) в режиме парно-концевых прочтений длиной 2 × 151 п. н.

2.3.3. Выравнивание прочтений и выявление генетических вариантов

Полученные прочтения картировали на референсную сборку генома соболя MarZib1 [192] с помощью алгоритма BWA-MEM пакета Burrows-Wheeler Aligner (BWA, версия 0.7.17) [193]. Прочтения-дубликаты выявляли и маркировали с помощью инструмента MarkDuplicates пакета Picard (версия 2.26.11) и исключали из последующего анализа [194].

Однонуклеотидные варианты и короткие вставки и делеции выявляли с помощью пакета Genome Analysis Toolkit (GATK, версия 4.2.2.0) [195]. Для каждого образца варианты определяли с помощью инструмента HaplotypeCaller. Полученные файлы GVCF объединяли с помощью CombineGVCFs, после чего выполняли совместное генотипирование с использованием GenotypeGVCFs. Аналогичную схему выявления генетических вариантов применяли при формировании исходного набора геномных данных соболей.

2.3.4. Анализ генетической структуры популяций на основе полногеномных данных

Для характеристики генетической структуры популяции соболей на основании данных секвенирования использовали несколько подходов. Анализ главных компонент проводили с использованием программы PLINK (версия 1.9) [196]. Генетическую структуру популяции реконструировали с использованием программы ADMIXTURE (версия 1.3) [197]. Предварительно с помощью программы PLINK отбирали несцепленные однонуклеотидные варианты (ОНВ). В ADMIXTURE не передавали информацию о популяционной принадлежности животных. Расчеты проводили при значениях параметра K от 2 до 10. Для каждого значения K выполняли три независимых расчета. Оптимальное значение параметра K определяли на основании ошибки перекрестной проверки и метода ΔK [198].

Попарное генетическое родство между восемью самками с репродуктивным долголетием и семью контрольными фермерскими самками оценивали с помощью программы PLINK (версия 1.9) с использованием команды --genome [196]. Анализ проводили на наборе ОНВ после исключения сцепленных вариантов. Для каждой пары животных рассчитывали показатель PI_HAT, характеризующий оценочную долю генома, идентичную по происхождению (identity by descent, IBD) [199]. Полученные значения использовали для выявления возможного близкого родства между животными и построения матрицы попарного родства.

2.3.5. Идентификация регионов, находящихся под действием отбора

Для выявления геномных регионов с выраженными различиями между группами проводили анализ методом скользящего окна размером 50 тыс. п. н. с шагом 25 тыс. п. н. Для каждого окна с использованием VCFtools (версия 0.1.16) [200] рассчитывали индекс генетической дифференциации F_{ST} и нуклеотидное разнообразие π. Значения F_{ST} стандартизировали с помощью Z-преобразования, а отношение нуклеотидного разнообразия между группами подвергали логарифмическому преобразованию по основанию 2. Отбирали окна с повышенными значениями $Z(F_{ST})$ (верхние 5 % распределения) и пониженным отношением π исследуемой группы к π группы сравнения (нижние 5 % распределения логарифмированного отношения). Для определения генов, расположенных в выявленных регионах, использовали аннотацию MarZib1_Hs, содержащую координаты генов в сборке MarZib1 и соответствия между генами соболя и их ортологами у человека [192]. Перекрытие выявленных регионов с аннотированными генами определяли по геномным координатам с помощью пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164]. Анализ функционального обогащения исследуемых общих наборов генов проводили анализ обогащения терминами Gene Ontology (GO) с использованием модуля g:GOSt ресурса g:Profiler, [174]. В качестве фонового множества использовали пользовательский набор аннотированных генов соболя, имеющих ортологи у человека. Статистически значимыми считали результаты при $FDR < 0,05$.

2.3.6. Идентификация генетических вариантов, связанных с длительным сохранением репродуктивной функции

Для идентификации генетических вариантов, связанных с длительным сохранением репродуктивной функции, проводили сравнение геномов восьми исследуемых самок с геномами семи контрольных фермерских самок. Из данных полногеномного секвенирования отбирали генетические варианты, альтернативный аллель которых присутствовал не менее чем у шести из восьми исследуемых самок, тогда как не менее пяти из семи контрольных самок были гомозиготны по референсному аллелю. В анализ включали генотипы с глубиной покрытия не менее 5 прочтений и показателем качества генотипирования не менее 20.

Функциональную аннотацию и прогнозирование последствий генетических вариантов выполняли с помощью программы SnpEff (версия 5.0e) [201]. Для функциональной интерпретации вариантов использовали аннотацию MarZib1_Hs, содержащую соответствия

между генами соболя и их ортологами у человека [192]. Для дальнейшего анализа отбирали варианты, отнесенные SnpEff к категориям HIGH и MODERATE. Для отобранных миссенс-вариантов потенциальное влияние аминокислотных замен на структуру и функцию белка оценивали с помощью веб-сервиса PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) [207]. Связь соответствующих генов с репродуктивной функцией и старением оценивали на основании опубликованных данных об их участии в оогенезе, фолликулогенезе, имплантации, эмбриональном развитии, старении и долгожительстве.

Дополнительно оценивали распределение миссенс-вариантов между хозяйствами, рассчитывая частоты альтернативных аллелей отдельно у четырёх исследуемых самок хозяйства «Русский соболь» и четырёх самок хозяйства «Салтыковский». В анализ включали генотипы с глубиной покрытия не менее 5 прочтений (DP $\geq$ 5) и качеством генотипирования не менее 20 (GQ $\geq$ 20).

2.3.7. Анализ эволюционной консервативности аминокислотных позиций

Для межвидовой оценки эволюционной консервативности аминокислотных позиций использовали ортологичные белковые последовательности 40 видов млекопитающих, представляющих различные отряды, включая Хищных, Приматов, Грызунов, Парнокопытных и Рукокрылых. При отборе видов учитывали их филогенетическое разнообразие. Ортологию проверяли с использованием Ensembl Compara (версия 116) и NCBI Gene Ortholog. Корректность исходной аннотации аминокислотных замен дополнительно проверяли путем сопоставления кодирующих последовательностей соболя с независимой референсной сборкой генома (GCA_040938815.1).

Множественные выравнивания белковых последовательностей строили с помощью программы MAFFT (версия 7.526) с использованием алгоритмов L-INS-i и G-INS-I [203]. Консервативность аминокислотных позиций оценивали, как долю видов, у которых сохранялась исходная аминокислота. При расчете учитывали только однозначно сопоставленные позиции в обоих выравниваниях, исключая пропуски и неоднозначные соответствия. Последовательность соболя использовали в качестве референса для сопоставления позиций, но не включали в расчет консервативности.

Локальную консервативность аминокислотных позиций визуализировали в виде графического представления последовательностей (sequence logo) с использованием веб-сервиса Skylign [204].

2.4. Молекулярно-генетическое исследование пациенток с нарушениями функции ооцитов

2.4.1. Клиническая и эмбриологическая характеристика пациенток

В молекулярно-генетическое исследование были включены две пациентки с первичным бесплодием и выраженными нарушениями функции ооцитов, выявленными в программах вспомогательных репродуктивных технологий. У пациентки № 1 наблюдалась остановка созревания ооцитов на стадии метафазы I, у пациентки № 2 – отсутствие визуально определяемой блестящей оболочки ооцитов. Клинические и эмбриологические данные были предоставлены специалистами клиник, в которых проводились программы вспомогательных репродуктивных технологий. При характеристике пациенток учитывали возраст, длительность и особенности течения бесплодия, показатели овариального резерва и гормонального статуса, число и стадии созревания полученных ооцитов, их морфологию, а также результаты оплодотворения и последующего эмбрионального развития.

Исследования проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Исследование пациентки с остановкой созревания ооцитов было одобрено Этическим комитетом Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (протокол № 6 от 7 апреля 2009 г.). Исследование пациентки с аномальной морфологией блестящей оболочки было одобрено Этическим комитетом Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (протокол № 5 от 1 декабря 2016 г.).

Пациентка № 1 (45 лет) имела 23-летний анамнез первичного бесплодия. Уровни ФСГ, ЛГ и АМГ составляли 10,21 мМЕ/мл, 8,91 мМЕ/мл и 1,6 нг/мл соответственно. В ходе программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) было получено шесть ооцитов, ни один из которых не достиг стадии метафазы II. У всех ооцитов наблюдалась остановка созревания на стадии метафазы I (MI).

Пациентка № 2 (32 года) имела двухлетний анамнез первичного бесплодия. Уровни ФСГ, ЛГ и пролактина составляли 6,13 мМЕ/мл, 5,91 мМЕ/мл и 265 мМЕ/л соответственно. В ходе программы ВРТ было получено 19 ооцитов, 11 из которых использовали для ИКСИ. У ооцитов отсутствовала визуально определяемая блестящая оболочка (Рисунок 9). Оплодотворения и последующего дробления не наблюдалось.

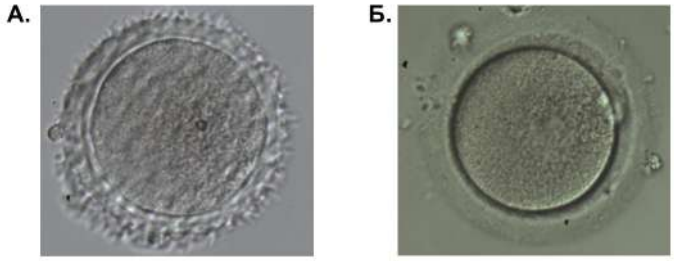


Рисунок 9 – Аномальная морфология блестящей оболочки. А – ооцит пациентки с аномальной морфологией блестящей оболочки. В – репрезентативный нормальный ооцит, окруженный интактной блестящей оболочкой

2.4.2. Выделение геномной ДНК и полногеномное секвенирование

Геномную ДНК выделяли с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Геномные библиотеки готовили с использованием наборов TruSeq DNA и Illumina DNA PCR-Free (Illumina, США). Количественную оценку полученных библиотек проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием набора KAPA Library Quantification Kit (Roche, Швейцария). Полногеномное секвенирование пациентки № 2 выполняли на платформе Illumina HiSeq 2000 (Illumina, США) в режиме парно-концевых прочтений длиной 2 × 101 п. н. Для пациентки № 1 секвенирование проводили на платформе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США) в режиме парно-концевых прочтений длиной 2 × 151 п. н.

2.4.3. Выравнивание прочтений, выявление и приоритизация генетических вариантов

Полученные прочтения выравнивали на референсную последовательность генома человека с использованием алгоритма BWA-MEM пакета Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [193]. Для пациентки № 1 использовали референсную сборку генома человека GRCh38, для пациенток № 2 – GRCh37. Генетические варианты выявляли с помощью инструмента HaplotypeCaller пакета Genome Analysis Toolkit (GATK) [195]. Для пациентки № 1 использовали GATK версии 4.5.0.0, для пациенток № 2 – версии 4.2.2.0.

Аннотацию функциональных последствий вариантов выполняли с использованием Ensembl Variant Effect Predictor (VEP, версия 104) [202] относительно соответствующей референсной сборки генома человека. Для дальнейшего анализа отбирали варианты,

потенциально влияющие на структуру белка или сплайсинг, с частотой аллеля менее 0,01 по данным Genome Aggregation Database (gnomAD, версии 2.1.1 для GRCh37 и 3.1.2 для GRCh38) [205].

При приоритизации вариантов учитывали опубликованные данные о функции соответствующих генов и их связи с созреванием ооцитов, формированием мейотического веретена, структурой блестящей оболочки, оплодотворением и ранним эмбриональным развитием.

2.4.4. In silico оценка функциональной значимости генетических вариантов пациенток

Для миссенс-вариантов потенциальное влияние аминокислотных замен на функцию белка оценивали с использованием алгоритмов SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, версия 5.2.2) [206] и PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, версия 2.2.2) [207]. Эволюционную консервативность аминокислотных позиций оценивали по множественному выравниванию ортологичных белковых последовательностей, выполненному с помощью Clustal Omega [208]. Доменную организацию белков и положение аминокислотных замен относительно функциональных доменов определяли с использованием InterPro [209]. Возможное влияние аминокислотных замен на пространственную структуру белка оценивали методом *in silico* моделирования с использованием AlphaFold Server [210]. Пространственное положение аминокислотных остатков и их локальное окружение в доступных трехмерных структурах белков анализировали с использованием PyMOL (версия 3.1) [211].

2.4.5. Подтверждение выявленных вариантов методом секвенирования по Сэнгеру

Вариант *TUBB8* c.527C>T подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру у пациентки № 1 и членов ее семьи. Для амплификации использовали праймеры TUBB8-F 5′-GCCAAGGGACACTACACC-3′ и TUBB8-R 5′-ACAGAGCTTCGTTATCTATGCAA-3′, разработанные с помощью программы Primer3 [212]. ПЦР проводили с использованием набора GenPack PCR Core («Изоген», Россия). Полученные ампликоны очищали с помощью набора Cleanup Standard («Евроген», Россия). Реакцию секвенирования выполняли с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в объеме 10 мкл.

Продукты реакции очищали с помощью колонок DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN, Германия) и анализировали на генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

2.4.6. Анализ транскриптомных данных

Для анализа экспрессии гена *ZP4* использовали данные RNA-seq, представленные в базе Gene Expression Omnibus (GEO), для различных стадий фолликулогенеза (GSE107746) [213], созревания ооцитов (GSE154762) [214] и доимплантационного развития эмбрионов человека (GSE71318) [215].

Для набора GSE107746 использовали значения $\log_2$(FPKM), для GSE154762 рассчитывали CPM на основе матрицы числа прочтений с последующим преобразованием $\log_2$(CPM + 1), для GSE71318 использовали значения $\log_2$(RPKM + 1). Для каждой стадии рассчитывали среднее значение экспрессии и стандартное отклонение. Обработку данных и построение графиков выполняли в среде R [216] с использованием пакета ggplot2 [217].

2.5. Интегративный анализ результатов

Для интегративного анализа использовали результаты трех сравнительно-геномных исследований, посвященных репродуктивному и пострепродуктивному долголетию млекопитающих, а также популяционно-геномного исследования соболя. Сопоставление эволюционно ускоренных регионов (ЭУР) проводили по координатам в референсной сборке генома человека GRCh38/hg38. Геномные интервалы предварительно приводили к единому формату BED. Для определения их координатных пересечений использовали инструменты intersect и multiinter пакета BEDTools (версия 2.29.1) [164]. Отдельно учитывали точные совпадения геномных интервалов и их частичные перекрытия.

На уровне генов объединяли результаты двух подходов к аннотации ЭУР: непосредственного перекрытия ускоренных регионов с генами и определения генов по регуляторным доменам с использованием GREAT (версия 4.0.4) [165]. Для каждого сравнительно-геномного исследования формировали отдельный набор уникальных генов. Для популяционно-геномного исследования соболя использовали гены, выявленные в кандидатных регионах генетической дифференциации. Обозначения генов приводили к номенклатуре генов человека, после чего повторяющиеся обозначения исключали.

Полученные наборы сопоставляли с генами из трех внешних источников: генами, связанными с возрастом естественной менопаузы, по данным Ruth и соавт. [15], генами, связанными с женским бесплодием и нарушениями полового развития, по данным Van Der Kelen и соавт. [218], а также генами старения и долголетия из базы данных GenAge ресурса Human Ageing Genomic Resources (HAGR) [219]. Из исследования Van Der Kelen и соавт. отбирали гены с уровнем клинической доказательности не ниже умеренного (moderate, strong или definitive). Для генов модельных организмов, представленных в GenAge, определяли ортологи человека с использованием инструмента g:Orth платформы g:Profiler [174].

Попарные пересечения наборов генов определяли с помощью скриптов на языке Python. Статистическую значимость обогащения оценивали с использованием одностороннего гипергеометрического теста, реализованного в библиотеке SciPy [161], с учетом соответствующих фоновых наборов генов. Степень обогащения рассчитывали как отношение наблюдаемого числа общих генов к ожидаемому при случайном пересечении наборов. Поправку на множественные сравнения проводили методом Бенджамини–Хохберга. Статистически значимыми считали результаты при $FDR < 0,05$.

Функциональное обогащение анализировали с использованием веб-ресурса Metascape (версия 3.5.20260701) [220]. В качестве фонового множества использовали гены человека, доступные для выявления во всех трех сравнительно-геномных исследованиях, определенные путем пересечения соответствующих фоновых наборов генов. Анализ включал категории Gene Ontology (GO), а также молекулярные пути Reactome [221], KEGG [222] и WikiPathways [223]. Функциональные категории отбирали при $p < 0,01$, числе генов не менее трех и коэффициенте обогащения $> 1,5$. Поправку на множественные сравнения проводили методом Бенджамини–Хохберга. Статистически значимыми считали категории при $FDR < 0,05$. Сходные функциональные термины объединяли в кластеры на основании перекрытия входящих в них генов. Для представления каждого кластера выбирали термин с наименьшим значением p.

Данные клинико-генетического исследования пациенток не включали в интегративный анализ геновых наборов. При этом отдельно проверяли, представлены ли изученные у пациенток гены в наборах, полученных по результатам других исследований настоящей работы, а также в наборах генов из внешних источников.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Эволюционно ускоренные геномные регионы у плацентарных млекопитающих (Placentalia) с длительным сохранением репродуктивной функции

3.1.1. Общие эволюционно ускоренные геномные регионы у плацентарных млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции

Для исследования длительного сохранения репродуктивной функции сравнивали виды плацентарных млекопитающих с поздним началом или слабо выраженными признаками репродуктивного старения и виды с выраженным возрастным снижением репродуктивной функции. В исследуемую группу вошли шесть видов: панамский белолицый капуцин (*Cebus capucinus imitator*), белохвостый олень (*Odocoileus virginianus*), полосатый мангуст (*Mungos mungo*), пятнистая гиена (*Crocuta crocuta*), северный морской слон (*Mirounga angustirostris*) и финвал (*Balaenoptera physalus*). Фоновую группу составили восемь видов, характеризующихся возрастным снижением репродуктивных показателей самок и отобранных с учетом филогенетического родства с видами исследуемой группы (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Филогенетическое дерево исследованных видов плацентарных млекопитающих. Розовым цветом выделены виды тестовой группы с длительным сохранением репродуктивной функции, голубым – виды фоновой группы

По последовательностям восьми видов фоновой группы было определено 1 409 178 консервативных аутосомных регионов длиной не менее 50 п. н. Далее для каждого из шести исследуемых видов оценивали наличие признаков ускоренной эволюции этих регионов.

Количество статистически значимых эволюционно ускоренных регионов у отдельных видов варьировало от 7 750 до 13 354 (Рисунок 11). Для выявления возможных общих геномных изменений, связанных с этим фенотипом, было проведено межвидовое сопоставление ЭУР.

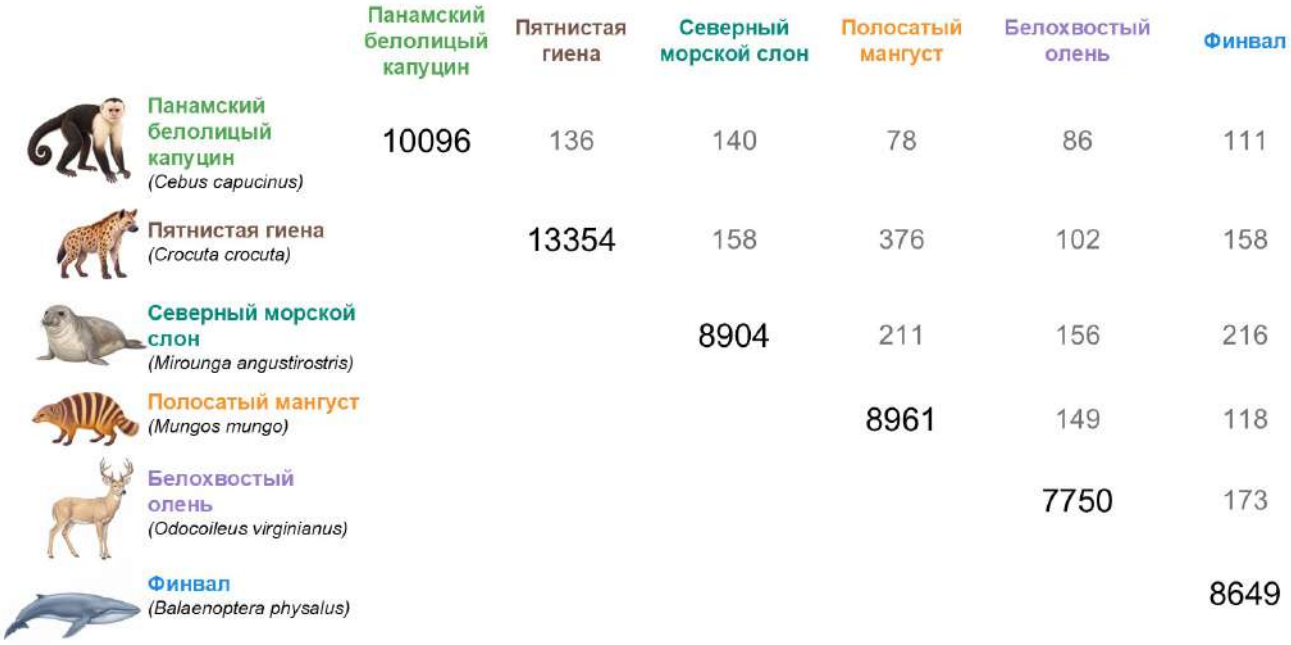


Рисунок 11 – Число эволюционно ускоренных регионов у исследованных видов плацентарных млекопитающих и их попарные пересечения

Дополнительно была оценена зависимость доли ЭУР от непрерывности геномных сборок и филогенетического расстояния до ближайшего фонового вида. Статистически значимой зависимости ни от N50 скаффолдов ($R^2 = 0{,}0004$, $p = 0{,}971$), ни от филогенетического расстояния ($R^2 = 0{,}468$, $p = 0{,}134$) выявлено не было (Приложение В, Таблица В.1).

Большинство ЭУР было характерно только для одного исследуемого вида. Вместе с тем в ряде консервативных участков ускоренная эволюция выявлялась у нескольких видов. При сопоставлении геномных координат было обнаружено 150 ЭУР, общих как минимум для трех из шести исследуемых видов. Число таких регионов статистически значимо превышало ожидаемое при случайном распределении ЭУР между видами (в среднем 1,37 региона, $p_{perm} \approx 10^{-6}$). ЭУР, общих по координатам для всех шести видов, выявлено не было. Для дальнейшего анализа были отобраны указанные 150 регионов.

Выявленные межвидовые различия в количестве и локализации ЭУР необходимо рассматривать с учетом особенностей использованного сравнительно-геномного подхода. Предварительное определение консервативных элементов по последовательностям фоновых видов позволяло выявлять изменения скорости нуклеотидных замен в участках генома, характеризующихся эволюционной консервативностью у других представителей исследуемых таксономических групп.

Особенностью настоящего исследования является сравнение видов, относящихся к различным отрядам плацентарных млекопитающих. Несмотря на сходство исследуемого репродуктивного признака, эти виды характеризуются существенными различиями в физиологии, продолжительности жизни и эволюционной истории. В связи с этим отсутствие ЭУР, общих для всех шести видов, не исключает возможности существования сходных молекулярных механизмов длительного сохранения репродуктивной функции.

В отличие от сравнительного анализа белок-кодирующих последовательностей, использованный подход позволял исследовать изменения скорости эволюции также в некодирующих участках генома. Такие участки представляют особый интерес в контексте межвидовых фенотипических различий, поскольку изменения могут затрагивать не только структуру белков, но и регуляцию экспрессии генов, включая ее тканевую и временную специфичность.

Для оценки потенциальной регуляторной функции общие ЭУР сопоставили с кандидатными цис-регуляторными элементами (ЦРЭ) генома человека из реестра ENCODE [166]. Возможность такого сопоставления обусловлена частичной эволюционной сохранностью регуляторных элементов. В частности, при сравнении геномов человека и мыши было показано, что 65 % ЦРЭ мыши, имеющих ортологичные последовательности у человека, также соответствуют ЦРЭ в его геноме [166]. На использовании ортологичных последовательностей основаны и подходы к предварительному прогнозированию кандидатных ЦРЭ у других видов млекопитающих [224]. В результате сопоставления с кандидатными ЦРЭ человека перекрывались 32 общих ЭУР. Из них 17 ЭУР перекрывались с энхансероподобными, а два – с промотороподобными элементами (Таблица В.2).

3.1.2. Распределение эволюционно ускоренных регионов по генам у исследуемых видов

Для выявления общих особенностей распределения ЭУР у исследуемых видов анализ проводили как на уровне совпадающих геномных регионов, так и на уровне генов и их регуляторных доменов. При первом подходе учитывали совпадение геномных координат ЭУР у нескольких исследуемых видов, при втором – наличие ЭУР в пределах одних и тех же генов или их регуляторных доменов у всех шести видов независимо от совпадения координат самих регионов. Гены аннотировали как по непосредственному перекрытию с ЭУР, так и по расположению ЭУР в их регуляторных доменах. Границы регуляторных доменов определяли с учетом расположения соседних генов и возможного расширения до 1 Мб от сайта начала

транскрипции. Это позволяло учитывать потенциальные дистальные регуляторные элементы, включая энхансеры [165].

В рамках первого подхода анализировали 150 ЭУР, общих не менее чем для трех из шести исследуемых видов. При сопоставлении их геномных координат с аннотацией генов было выявлено 63 гена, непосредственно перекрывающихся с этими регионами. С учетом расположения ЭУР в регуляторных доменах было определено 250 генов (Таблица В.3).

При втором подходе межвидовое сходство оценивали на уровне генов и их регуляторных доменов независимо от совпадения координат ЭУР. Такой подход учитывал возможность того, что ускоренная эволюция у разных видов затрагивает различные участки одного и того же гена [225,226]. В результате было выявлено 149 генов (Таблица В.3), в пределах которых ЭУР присутствовали у всех шести исследуемых видов, и 960 генов, в регуляторных доменах которых ЭУР были обнаружены у каждого из шести видов (Рисунок 12).

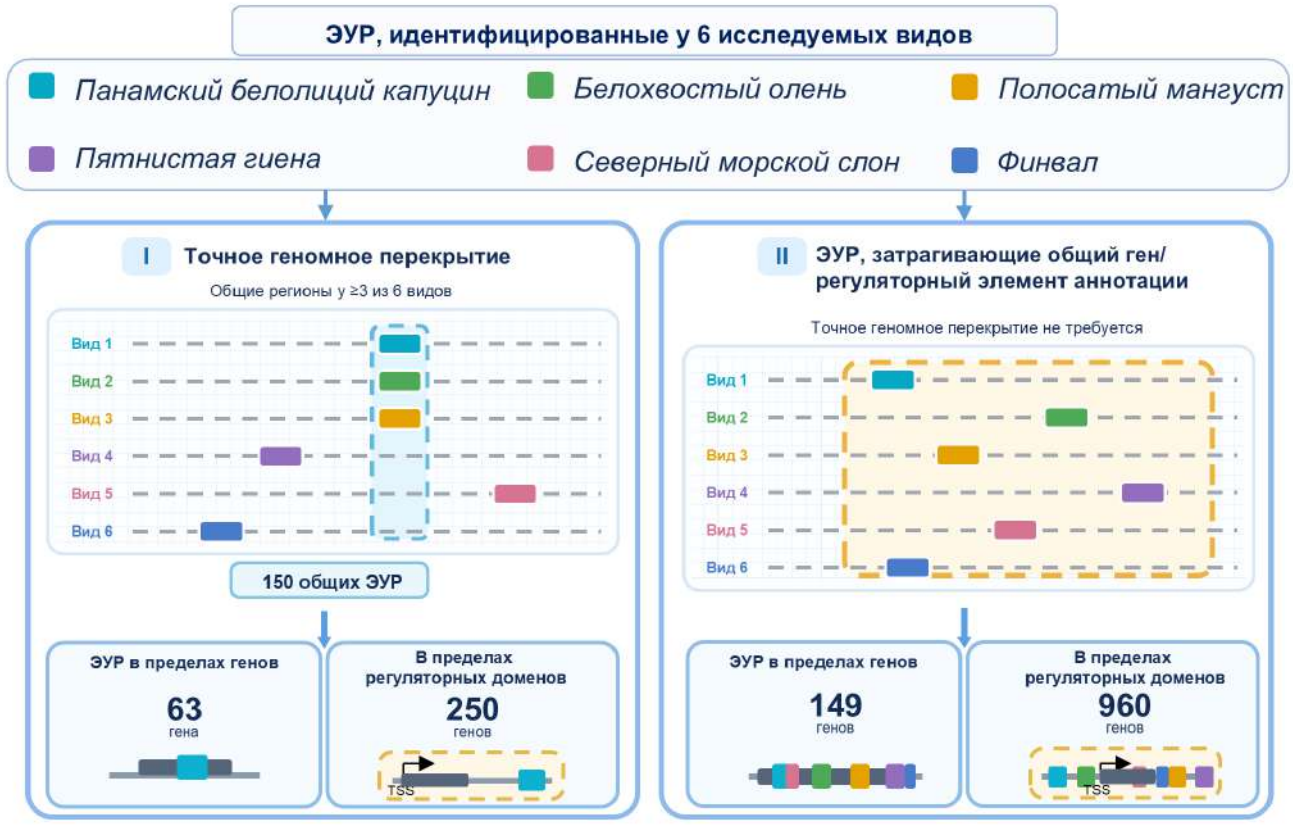


Рисунок 12 – Схематическое представление двух подходов к определению генов с эволюционно ускоренными регионами. I – сопоставление ЭУР, общих по геномным координатам не менее чем для трех из шести исследуемых видов. II – сопоставление на уровне генов независимо от совпадения координат ЭУР у разных видов. Цветами обозначены исследуемые виды. Расположение ЭУР показано условно

Отдельный интерес представляет ген *ZBTB20*, выявленный при обоих подходах к межвидовому сопоставлению ЭУР. Он входил в число генов, непосредственно перекрывающихся с общими ЭУР, а также характеризовался наличием ЭУР в пределах гена у

всех шести исследуемых видов (Таблица В.3, Рисунок 13, Рисунок В.2). *ZBTB20* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в развитии нервной системы и нейроэндокринной регуляции репродуктивной функции. Нарушение функции гена приводило к отсутствию зрелых лактотрофов, тогда как его избирательное выключение в этих клетках у взрослых животных сопровождалось снижением экспрессии и секреции пролактина, нарушением развития молочных желез и лактации [227,228]. Кроме того, в исследовании Guan et al. (2026) была выявлена связь вариантов *ZBTB20* с врожденным гипогонадотропным гипогонадизмом у человека. Эксперименты на мышах с условным выключением *Zbtb20* в нервной системе показали нарушения развития и миграции нейронов, продуцирующих гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ), сопровождавшиеся снижением уровней гонадотропинов, гипогонадизмом и бесплодием [229]. Эти данные свидетельствуют об участии *ZBTB20* в нейроэндокринных механизмах регуляции репродуктивной функции.

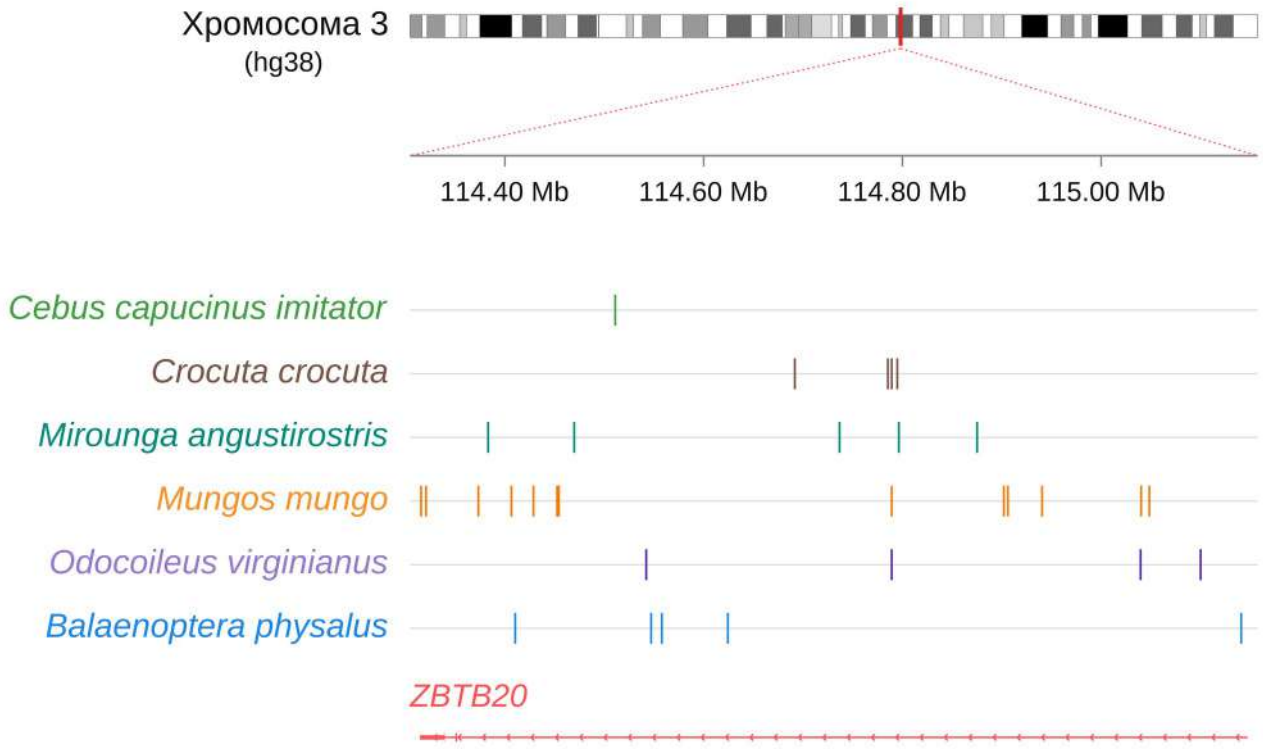


Рисунок 13 – Распределение эволюционно ускоренных регионов в пределах гена ZBTB20 у шести исследуемых видов плацентарных млекопитающих. Координаты приведены относительно референсного генома человека GRCh38 (hg38). Вертикальными штрихами обозначено положение ЭУР, ширина штрихов условная

Для выявления регуляторных доменов генов с повышенной концентрацией ЭУР («горячих точек» ускоренной эволюции) для каждого исследуемого вида оценивали число ЭУР и определяли, в каких доменах оно статистически значимо превышало ожидаемое с учетом количества консервативных регионов, протестированных на ускорение (FDR < 0,05) (Рисунок 14). Среди генов с большим числом ЭУР особый интерес с точки зрения репродуктивной

функции представляет *ABCC4*, в регуляторном домене которого у белохвостого оленя было выявлено 106 ЭУР. Экспериментально показано, что *ABCC4* обеспечивает транспорт простагландина E2 из гранулезных клеток, а фармакологическое подавление его активности нарушает овуляцию у мышей [230].

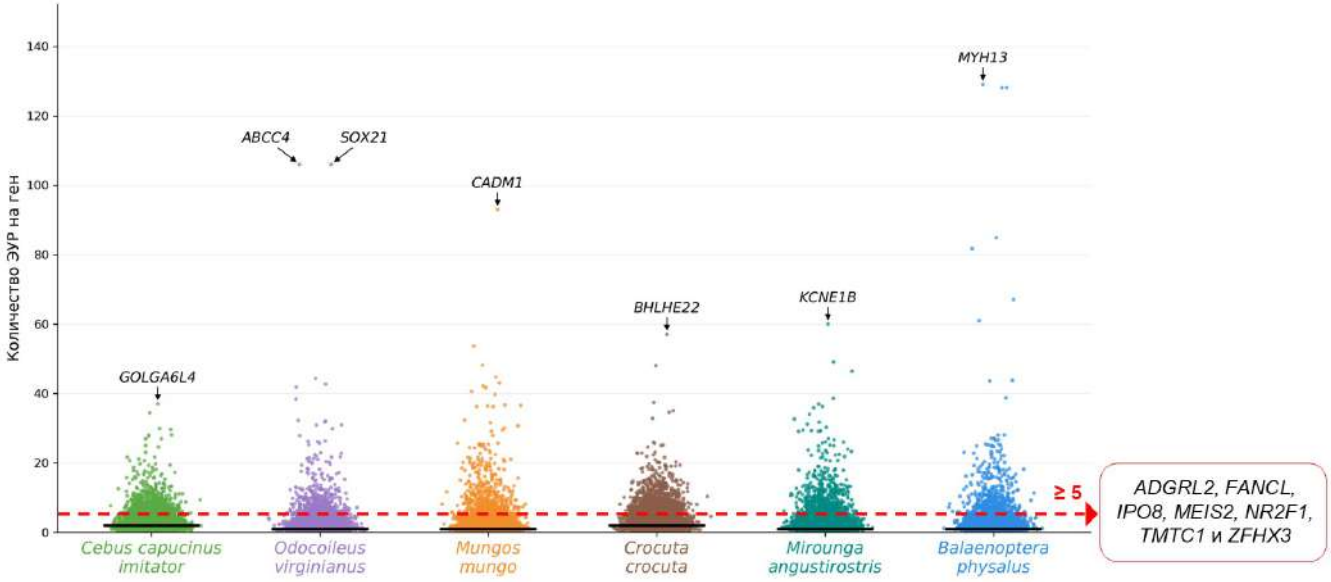


Рисунок 14 – Распределение числа эволюционно ускоренных регионов в регуляторных доменах генов у плацентарных млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции. Каждая точка соответствует отдельному гену. Стрелками отмечены гены с наибольшим числом ЭУР у каждого вида. Справа представлены семь генов, в регуляторных доменах которых у каждого из шести видов выявлено не менее пяти ЭУР

Далее оценивали, встречается ли повышенное число ЭУР в регуляторных доменах одних и тех же генов у всех шести исследуемых видов. При использовании критерия не менее пяти ЭУР у каждого вида было выявлено семь генов: *ADGRL2, FANCL, IPO8, MEIS2, NR2F1, TMTC1 и ZFHX3* (Рисунок 14). Особый интерес представляют три гена, для которых ранее была показана связь с различными аспектами репродуктивной функции. Экспериментально установлено, что *IPO8* необходим для поддержания жизнеспособности ранних эмбрионов у рыб [231]. Ген *FANCL* участвует в репарации ДНК, а варианты в этом гене были выявлены у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников [232]. Для *ZFHX3* показана роль в формировании веретена деления и сегрегации хромосом при мейозе I ооцитов мышей [233].

Интересно, что множественные ЭУР в регуляторном домене гена *FANCL* ранее были обнаружены и в других сравнительно-геномных исследованиях. Так, Ferris et al. (2018), используя алгоритм аннотации на основе GREAT, выявили наибольшее число ЭУР у африканского слона именно в регуляторном домене данного гена (289 ЭУР) [41]. В дальнейшем Tollis et al. (2021) показали статистически значимое обогащение ЭУР в регуляторном домене *FANCL* как у африканского, так и у азиатского слона [42]. В указанных работах данный ген

рассматривался преимущественно в контексте механизмов репарации ДНК и устойчивости к онкологическим заболеваниям.

Накопление ЭУР в отдельных геномных локусах наблюдалось и при исследовании более древних эволюционных линий. В частности, Trigila et al. (2025) выявили 30 ускоренных некодирующих регионов в пределах гена *NPAS3* в предковой линии млекопитающих. Множественные ЭУР в области этого гена были также обнаружены при исследовании эволюции птиц и приматов [44]. Эти данные показывают, что отдельные геномные локусы могут неоднократно подвергаться ускоренной эволюции в различных филогенетических линиях.

3.1.3. Функциональная характеристика генов с эволюционно ускоренными регионами

Для функциональной характеристики генов, связанных с выявленными ЭУР, был проведен анализ обогащения категориями GO и оценена тканевая специфичность их экспрессии. Оба анализа выполняли отдельно для двух наборов генов, в пределах которых или в регуляторных доменах которых ЭУР были обнаружены у всех шести исследуемых видов. Анализ 149 генов, содержащих ЭУР непосредственно в пределах генов у всех шести исследуемых видов, показал статистически значимое обогащение категориями GO, связанными с развитием нервной системы (nervous system development, GO:0007399), нейрогенезом (neurogenesis, GO:0022008), межклеточной адгезией (cell-cell adhesion, GO:0098609) и организацией синапсов (synapse organization, GO:0050808). Для 960 генов, в регуляторных доменах которых ЭУР присутствовали у всех шести исследуемых видов, было установлено статистически значимое обогащение категориями GO, связанными с репродуктивной и эндокринной функцией, включая endocrine system development (GO:0035270) и response to hormone (GO:0009725). В их число также входили категории развития репродуктивной системы и гонад (reproductive system development, GO:0061458; gonad development, GO:0008406), половой дифференцировки (sex differentiation, GO:0007548) и гормон-опосредованного сигнального пути (hormone-mediated signaling pathway, GO:0009755). В категорию клеточного ответа на фолликулостимулирующий гормон (cellular response to follicle-stimulating hormone stimulus, GO:0071372, FDR = 0,045) входили гены *EDNRA, EFNA5 и INHBA* (Таблица В.4). Экспериментально показано участие рецептора *EDNRA* в сокращении фолликула при овуляции [234] белка EFNA5 – в регуляции морфологии и адгезии клеток гранулезы [235]. Активин А, кодируемый геном *INHBA*, повышает экспрессию рецептора ФСГ в гранулезных клетках [236]. Вместе с тем при интерпретации нейробиологических результатов необходимо учитывать, что многие гены с преимущественной экспрессией в нервной

ткани характеризуются значительной протяженностью, преимущественно за счет длинных интронов [237,238]. Это может увеличивать число консервативных регионов, доступных для тестирования на ускорение, и влиять на результаты обогащения нейробиологическими категориями GO.

Анализ тканевой специфичности экспрессии проводили с использованием фоновых наборов генов, сформированных на основе консервативных регионов, которые были использованы в анализе на ускоренную эволюцию. Среди 149 генов, содержащих ЭУР у всех шести исследуемых видов, было выявлено статистически значимое обогащение генами с преимущественной экспрессией в коре головного мозга. При анализе генов, определенных по расположению ЭУР в регуляторных доменах, значимое обогащение было выявлено не только для коры головного мозга, но и для эндометрия, щитовидной железы, яичника и сердечной мышцы (Рисунок В.1). С учетом исследуемого фенотипа дальнейшее сопоставление ограничили корой головного мозга, эндометрием, яичником и щитовидной железой, выделив 16 генов с повышенной экспрессией не менее чем в двух из этих тканей (Таблица В.5). Для *NTRK2*, характеризовавшегося повышенной экспрессией в коре головного мозга и щитовидной железе, имеются независимые экспериментальные данные об участии в поддержании жизнеспособности ооцитов. Специфическая инактивация *Ntrk2* в ооцитах мышей сопровождалась их гибелью после полового созревания, нарушением организации фолликулов и ранним бесплодием [239].

Данные о возможной роли *PRLHR*, характеризовавшегося повышенной экспрессией в коре головного мозга и эндометрии, менее однозначны. В одном исследовании была показана экспрессия этого гена в децидуальной ткани человека и его участие в регуляции секреции пролактина [240], тогда как в другом соответствующие результаты не подтвердились [241].

При сопоставлении результатов анализа тканевой экспрессии с данными о перекрытии ЭУР с кандидатными цис-регуляторными элементами (ЦРЭ) генома человека из реестра ENCODE среди 16 ранее выделенных генов особый интерес представляют *SLC4A3* и *HTR1E* (Таблица В.6). Оба гена характеризуются повышенной экспрессией в яичнике, а в их регуляторных доменах у всех шести исследуемых видов были обнаружены ЭУР, перекрывающиеся с ЦРЭ.Ген *SLC4A3* кодирует анионный обменник AE3, участвующий в регуляции внутриклеточного pH посредством обмена ионов хлора и бикарбоната [242]. Ген *HTR1E* кодирует рецептор серотонина 5-HT1E, для которого экспериментально показано участие в регуляции пролиферации опухолевых клеток яичника [243]. При этом у разных видов ЭУР располагались в различных участках регуляторных доменов. Выявленные перекрытия позволяют предполагать потенциальную регуляторную функцию этих участков.

Таким образом, сравнительно-геномный анализ позволил выявить консервативные участки генома, характеризующиеся ускоренной эволюцией у нескольких видов плацентарных

млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции. При этом ЭУР обнаруживались как в совпадающих по координатам геномных участках, так и в различных участках одних и тех же генов и их регуляторных доменов. Функциональный анализ выявленных генов показал обогащение категориями GO, связанными с развитием нервной системы, репродуктивными и эндокринными процессами. Сопоставление результатов проведённых анализов позволило выделить гены, известные функции которых могут иметь значение для длительного сохранения репродуктивной способности.

3.2. Генетические факторы репродуктивного долголетия у соболя (*Martes zibellina*)

3.2.1. Анализ генетической структуры выборки на основе полногеномных данных

Для поиска генетических факторов, связанных с длительным сохранением репродуктивной функции и высокой плодовитостью, были проанализированы данные полногеномного секвенирования 53 соболей (*Martes zibellina*). В выборку вошли 32 диких животных и 21 соболь из зверохозяйств, включая 7 животных контрольной группы и 8 самок, у которых по данным многолетних наблюдений репродуктивная функция и высокая плодовитость сохранялись до позднего возраста (далее – самки с репродуктивным долголетием). Подробная характеристика исследованных животных и критерии формирования групп представлены в разделе 2.3 и в приложении Г. Самки с репродуктивным долголетием характеризовались ранним началом размножения, большим количеством щенков в помете и длительным репродуктивным периодом. Соотношение продолжительности репродуктивного периода и среднего числа щенков в год у самок с репродуктивным долголетием представлено на рисунке 15.

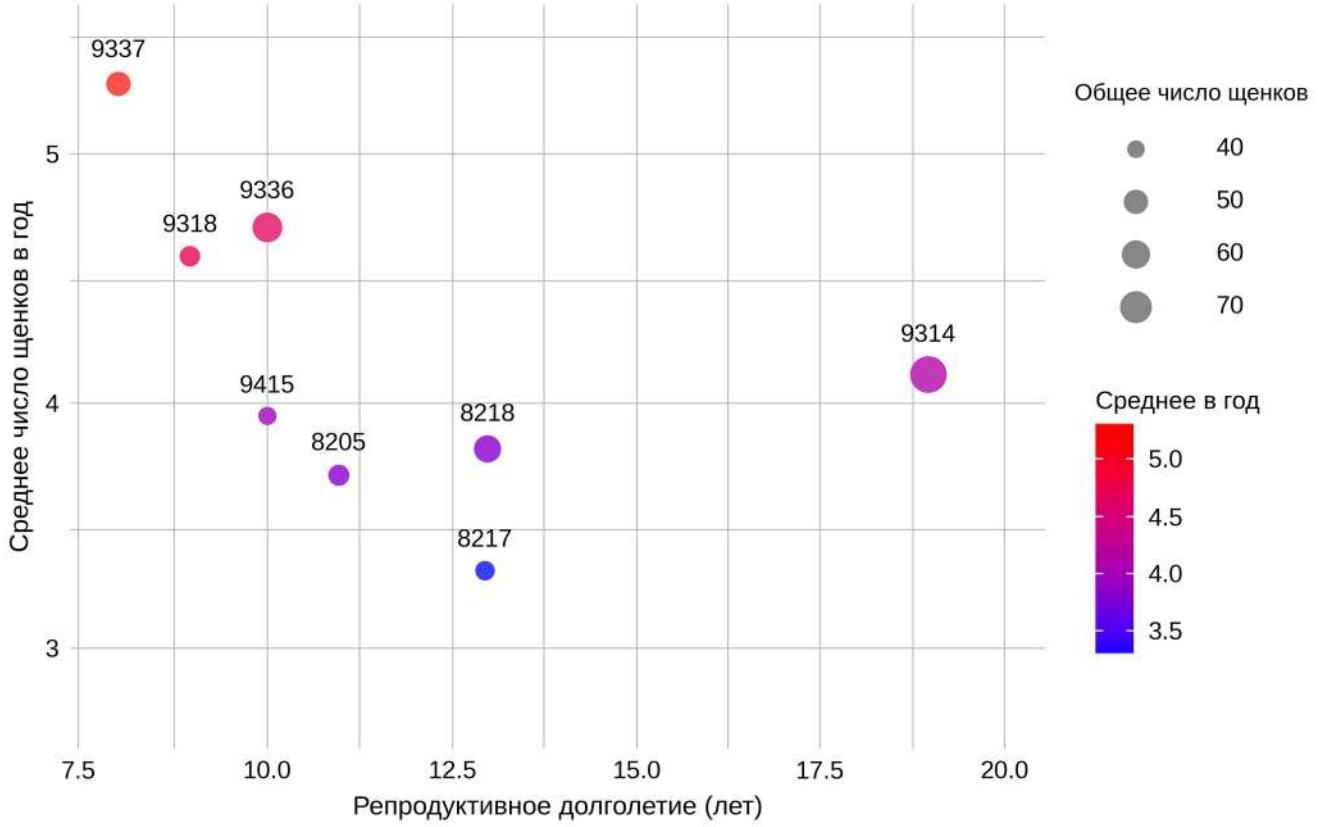


Рисунок 15 – Данные по среднему числу щенков в год и продолжительности репродуктивного периода у самок соболей (*Martes zibellina*) с длительной репродуктивной функцией и плодовитостью

Для выявления генетических особенностей, связанных с изучаемым фенотипом, сравнивали геномы восьми самок с репродуктивным долголетием и семи самок контрольной фермерской группы. Дополнительно использовали геномные данные соболей из естественных популяций (далее дикие соболи), чтобы отличить особенности исследуемой группы от генетических различий, обусловленных фермерским происхождением животных.

Для оценки генетической структуры всей выборки, включавшей 53 особи соболя обоих полов, проанализировали 487 768 ОНВ, отобранных после фильтрации по неравновесному сцеплению. С помощью метода ADMIXTURE, который позволяет оценить долю различных генетических компонентов в геноме каждого животного, были выявлены три компонента (K = 3), условно обозначенные как «камчатский», «уральский» и «итурупский» в соответствии с ранее предложенной классификацией (Рисунок 16) [192]. У всех восьми самок с репродуктивным долголетием, так же, как и у обычных фермерских самок преобладал «камчатский» компонент, тогда как «уральский» встречался в небольшой доле, а «итурупский» практически отсутствовал. Таким образом, самки с репродуктивным долголетием были сходны с остальными фермерскими соболями по соотношению генетических компонентов.

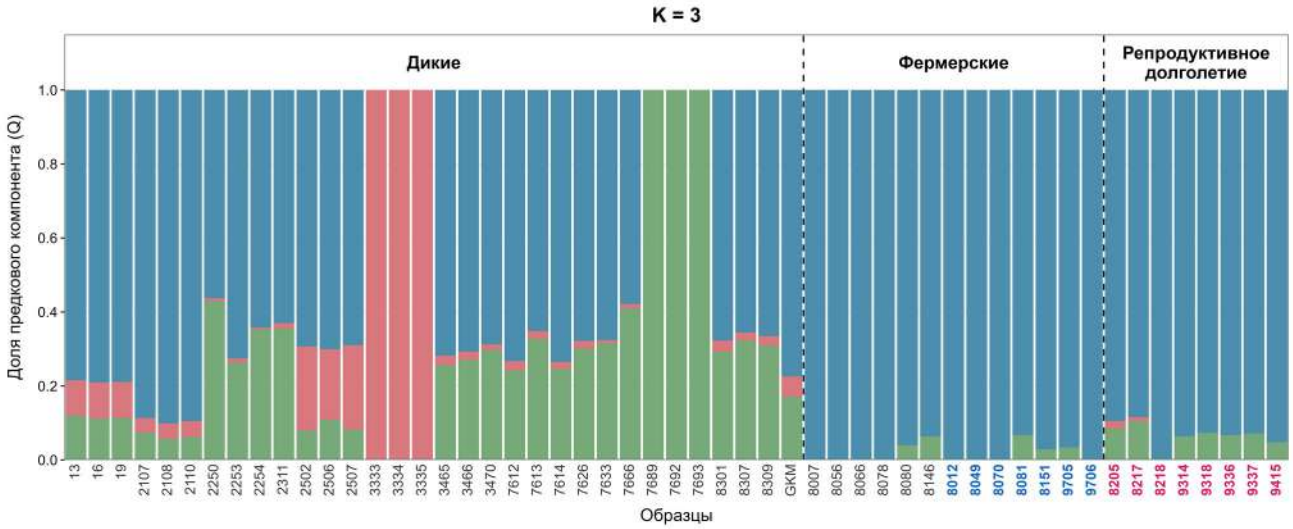


Рисунок 16 – Результаты анализа ADMIXTURE 53 образцов соболя на основании 487 768 несцепленных ОНВ. Представлены результаты для K = 3. Синим выделен «камчатский» компонент, зеленым – «уральский», красным – «итурупский». Идентификаторы образцов: красным отмечены образцы самок с репродуктивным долголетием (8205, 8217, 8218, 9314, 9318, 9336, 9337, 9415); синим отмечены обычные фермерские самки (8012, 8049, 8070, 8081, 8151, 9705, 9706)

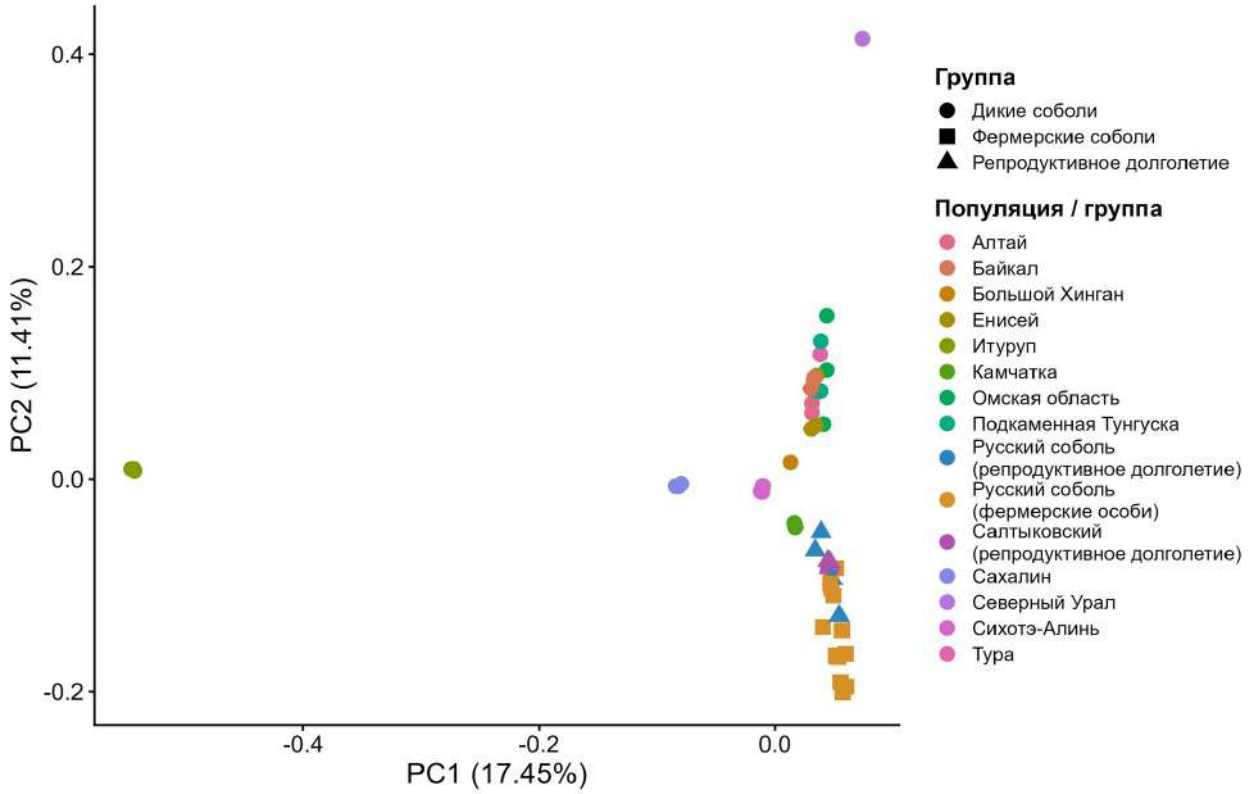


Рисунок 17 – Результаты анализа методом главных компонент 53 образцов соболя на основании 487 768 несцепленных ОНВ

Анализ методом главных компонент (PCA) для 53 образцов соболя показал сходную картину: самки с репродуктивным долголетием располагались вблизи остальных фермерских

соболей и не образовывали отдельного чётко обособленного кластера. При этом наблюдалось частичное разделение исследуемых и контрольных фермерских самок вдоль второй главной компоненты, которое могло быть связано с различиями в происхождении животных из разных зверохозяйств. Первая и вторая главные компоненты объясняли соответственно 17,45 и 11,41 % общей генетической изменчивости.

Дополнительно был проведён анализ попарного родства между 15 самками исследуемой и контрольной фермерских групп, который не выявил близкородственных пар первой степени (Рисунок Г.2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженной генетической обособленности самок с репродуктивным долголетием относительно контрольных фермерских животных. Это снижает вероятность того, что выявленные при последующем сравнении межгрупповые различия обусловлены исключительно общей популяционной структурой выборки.

3.2.2. Геномные регионы, потенциально находящиеся под действием отбора

Для поиска геномных регионов, потенциально связанных с репродуктивным долголетием и плодовитостью, восьми самок с репродуктивным долголетием сравнили с контрольными семью фермерскими самками по двум показателям: межгрупповой генетической дифференциации (F_{ST}) и нуклеотидному разнообразию (π). Повышенные значения F_{ST} отражают различия частот аллелей между группами, тогда как снижение π указывает на уменьшение генетического разнообразия внутри группы. Поэтому в качестве кандидатных рассматривали геномные окна, в которых повышенная дифференциация между группами сочеталась со сниженным нуклеотидным разнообразием у исследуемых самок. Полногеномный анализ выявил группу геномных окон, одновременно характеризовавшихся высокими значениями $Z(F_{ST})$ и сниженным нуклеотидным разнообразием у самок с репродуктивным долголетием (Рисунок 18).

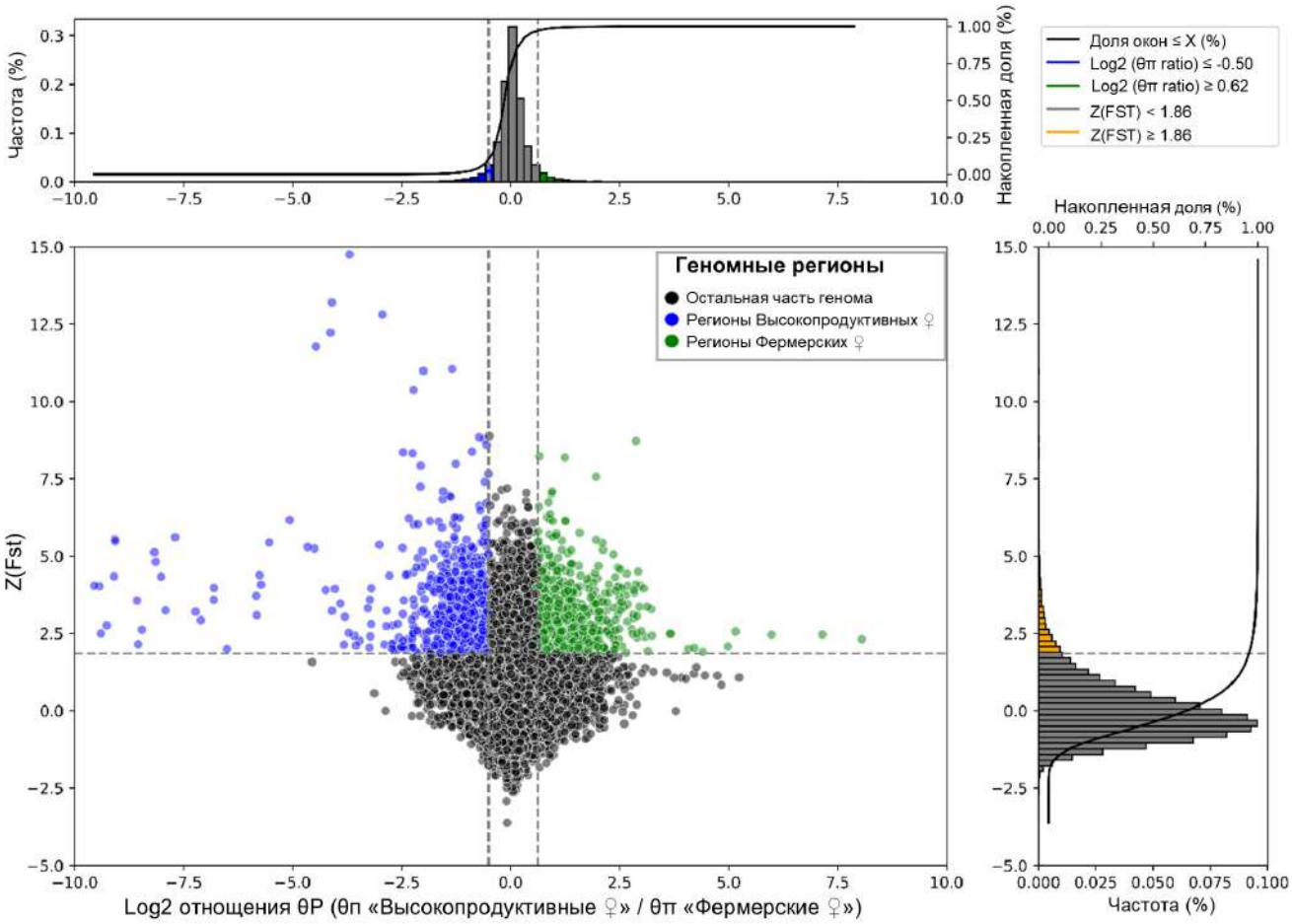


Рисунок 18 – Полногеномный поиск кандидатных регионов по значениям F_{ST} и нуклеотидного разнообразия при сравнении самок с репродуктивным долголетием и контрольных фермерских самок. По оси X представлено $\log_2$-отношение нуклеотидного разнообразия π в группе самок с репродуктивным долголетием и контрольной фермерской группе, по оси Y – стандартизованное значение F_{ST}. Пунктирными линиями показаны пороговые значения, соответствующие крайним 5 % распределений. Синим цветом обозначены регионы с повышенной межгрупповой дифференциацией и сниженным нуклеотидным разнообразием в группе самок с репродуктивным долголетием; зеленым – регионы со сниженным разнообразием в группе фермерских животных. В верхней и правой частях рисунка представлены распределения соответствующих показателей

После объединения перекрывающихся геномных окон они были отнесены к кандидатным геномным регионам, потенциально находящимся под действием отбора. В результате сравнения было выделено 1166 кандидатных геномных регионов, в пределах которых по аннотации генома соболя выявлено 419 генов (Таблица Г.2).

Дополнительно было проведено сравнение восьми исследуемых самок соболя с репродуктивным долголетием с 17 дикими самками, чтобы оценить их геномные особенности относительно животных из природных популяций. В результате было выявлено 1054 кандидатных региона, связанных с 281 генами (Таблица Г.2).

При сопоставлении двух наборов генов было выявлено 73 гена, общих для обоих сравнений самок соболя с репродуктивным долголетием (Рисунок 19, Таблица Г.2). Эти гены рассматривали как кандидатов для дальнейшего изучения молекулярно-генетических факторов, потенциально связанных с репродуктивным долголетием и плодовитостью исследуемых самок.



Рисунок 19 – Пересечение наборов генов, выявленных при сравнении самок с репродуктивным долголетием с контрольными фермерскими и дикими самками

Для функциональной характеристики 73 генов, общих для двух сравнений, был проведён анализ обогащения терминами Gene Ontology (GO). В результате выявлены два статистически значимых биологических процесса, связанных с созреванием нейронов (GO:0042551) и отрицательной регуляцией сигнального пути фосфолипазы C / протеинкиназы C (GO:0160195) (FDR = 0,0419 для обоих терминов) (Таблица Г.3). Среди 73 генов особый интерес представляли гены, связанные с поддержанием овариального резерва, мейотическим созреванием ооцитов, репарацией ДНК и процессами старения. *SYCP2L* ассоциирован с возрастом естественной менопаузы и участвует в поддержании запаса примордиальных ооцитов: у мышей инактивация *Sycp2l* приводит к ускоренному возрастному истощению овариального резерва и снижению фертильности [32,244]. *PALB2*, участвующий в гомологичной рекомбинации и репарации двунитевых разрывов ДНК, также связан с овариальным старением: редкие повреждающие варианты этого гена ассоциированы с изменением возраста естественной менопаузы [32]. *PLK1* является одним из ключевых регуляторов мейотического созревания ооцитов и необходим для формирования веретена деления, правильной организации хромосом и их сегрегации в мейозе [245]. В полученный набор также вошел *CXCR4*, участвующий в регуляции перехода примордиальных фолликулов к росту, что непосредственно связано с динамикой расходования

овариального резерва [248]. Отдельного внимания заслуживает *ELOVL2*: возраст-зависимое метилирование этого гена является одним из наиболее воспроизводимых молекулярных маркеров старения, а экспериментальные данные указывают и на функциональное участие *ELOVL2* в возрастных изменениях сетчатки, связанных с липидным обменом [249,250].

Таким образом, среди 73 генов, общих для двух сравнений самок соболя с репродуктивным долголетием, выявлены гены, участвующие в поддержании овариального резерва, мейотическом созревании ооцитов, репарации ДНК и процессах старения. Эти гены представляют интерес для дальнейшего изучения молекулярно-генетических факторов репродуктивного долголетия у соболя.

Сочетание показателей межгрупповой генетической дифференциации (F_{ST}) и нуклеотидного разнообразия (π) широко применяется для выявления предполагаемых маркеров отбора у сельскохозяйственных животных. В частности, такой подход использовали при поиске геномных регионов, потенциально связанных с плодовитостью овец [251,252] и репродуктивной продуктивностью свиней [253]. В исследованиях российских пород крупного рогатого скота показатели F_{ST} и π также применяли в составе комплексного анализа маркеров отбора, в том числе при выявлении регионов, содержащих гены, участвующие в репродуктивных процессах [254,255]. Вместе с тем повышенная межгрупповая дифференциация и снижение нуклеотидного разнообразия могут быть обусловлены не только действием отбора, но и особенностями популяционной структуры и демографической истории животных. Поэтому выявленные в настоящем исследовании геномные регионы рассматриваются как кандидаты, потенциально находящиеся под действием отбора и представляющие интерес для дальнейшего изучения генетических факторов репродуктивного долголетия у соболя.

3.2.3. Генетические варианты, ассоциированные с репродуктивным долголетием у соболя

На следующем этапе исследования был проведен полногеномный поиск кандидатных однонуклеотидных вариантов, потенциально связанных с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью у соболя. Для этого сравнивали данные полногеномного секвенирования восьми самок с репродуктивным долголетием и семи контрольных фермерских самок. На первом этапе отбирали однонуклеотидные варианты, альтернативный аллель которых присутствовал не менее чем у шести из восьми самок с репродуктивным долголетием, тогда как не менее пяти из семи контрольных самок были гомозиготны по референсному аллелю. После фильтрации

генотипов по глубине покрытия, качеству генотипирования и соотношению аллельных прочтений был сформирован набор из 89 804 однонуклеотидных вариантов.

Из 89 804 однонуклеотидных вариантов 657 локализовались в кодирующих последовательностях генов. Среди них было выявлено 220 миссенс-вариантов (Рисунок 20).

Для дальнейшей приоритизации миссенс-вариантов учитывали известную функциональную роль соответствующих генов в репродуктивных процессах, старении, поддержании клеточного гомеостаза и энергетическом обмене. Для отобранных вариантов предполагаемое влияние аминокислотных замен на структуру и функцию белка оценивали с использованием PolyPhen-2. Дополнительно определяли консервативность соответствующих аминокислотных позиций по выравниванию гомологичных белковых последовательностей. Координаты функционально приоритетных миссенс-вариантов также сопоставляли с координатами кандидатных геномных регионов, выявленных и описанных в подразделе 3.2.2, для определения вариантов, расположенных в пределах этих регионов.

По результатам PolyPhen-2 к категориям «вероятно повреждающий» (probably damaging) или «возможно повреждающий» (possibly damaging) были отнесены варианты в генах *ASPM, COQ7, DNAJC21, FBXO43, HIPK4, ILDR1, MOS, PPM1N, RESF1, RREB1, SYBU* и *VGLL4* (Таблица Г.4). Среди этих генов можно выделить гены, связанные с мейозом и репродуктивной функцией (*FBXO43, MOS*), биосинтезом коэнзима Q (*COQ7*), а также нейрогенезом и внутриклеточным транспортом (*ASPM, SYBU*).

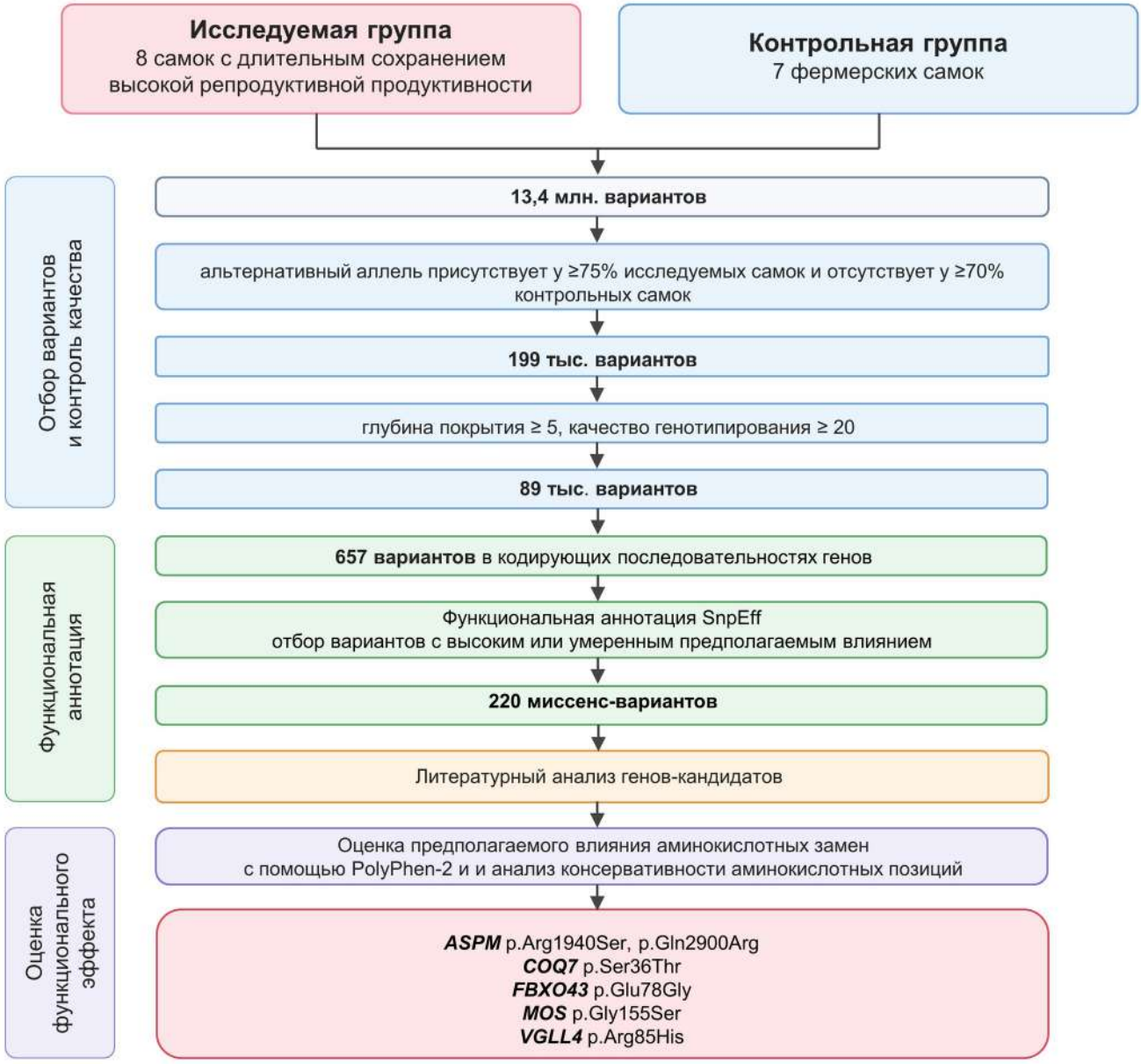


Рисунок 20 – Схема отбора и функциональной характеристики кандидатных миссенс-вариантов, потенциально связанных с репродуктивным долголетием у соболя

На основании функциональной роли генов, результатов PolyPhen-2 и консервативности аминокислотных позиций особый интерес представляли варианты в генах *ASPM* p.(Gln2900Arg), *MOS* p.(Gly155Ser), *VGLL4* p.(Arg85His), а также *COQ7* p.(Ser36Thr) и *FBXO43* p.Glu78Gly (Рисунок 21, Рисунок Г.3).

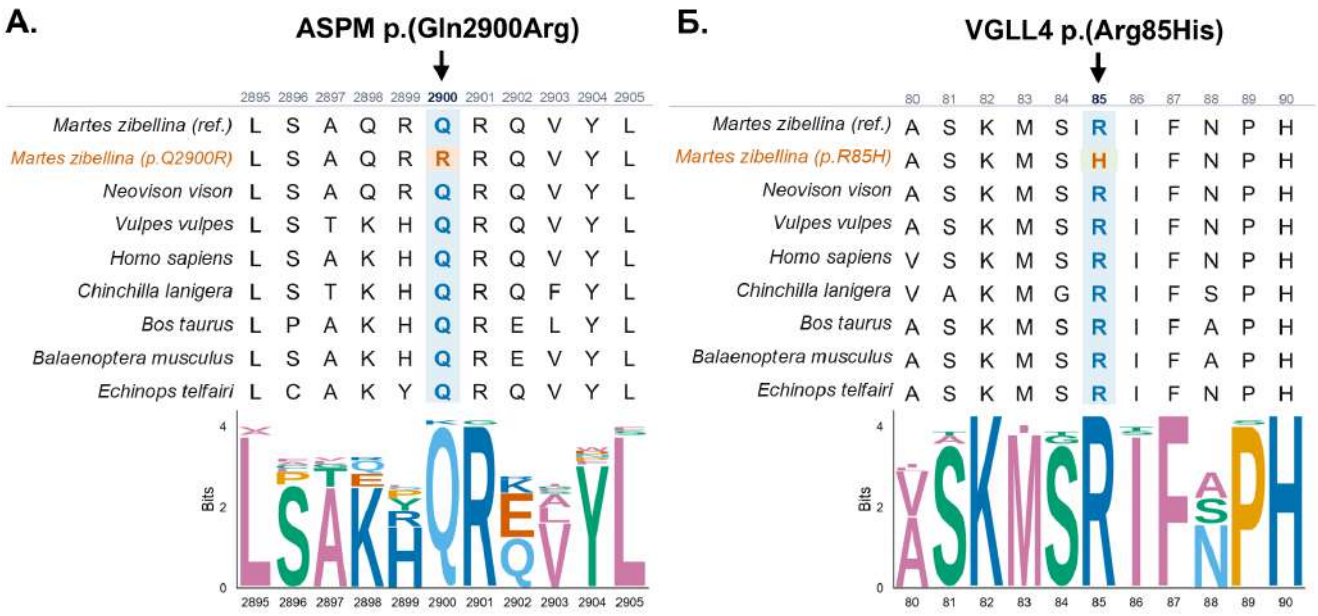


Рисунок 21 – Эволюционная консервативность аминокислотных позиций вариантов ASPM p.(Gln2900Arg) (А) и VGLL4 p.(Arg85His) (Б). Представлены фрагменты множественного выравнивания белковых последовательностей млекопитающих и соответствующие логотипы последовательностей. Стрелками обозначены позиции аминокислотных замен

Гены *FBXO43, MOS* и *ASPM* непосредственно связаны с мейотическим созреванием ооцитов. В экспериментах на ооцитах *Xenopus laevis* было показано, что белок FBXO43 (EMI2) ингибирует комплекс APC/C и необходим для перехода ко второму мейотическому делению и остановки ооцита в метафазе II [256]. MOS участвует в регуляции мейоза ооцитов через сигнальный путь MAPK. Было показано, что у мышей с дефицитом *Mos* снижается фертильность, а ооциты не способны поддерживать остановку в метафазе II [257]. Ген *ASPM* кодирует белок, локализующийся в мейотическом веретене ооцитов мыши, а снижение его экспрессии приводит к нарушениям сборки веретена и задержке мейотического созревания [258]. Кроме того, у мышей с инактивацией *Aspm* отмечены уменьшение числа развивающихся фолликулов и нарушения эстральной цикличности, сохраняющиеся при старении [259].

Ген *COQ7* связан с митохондриальным метаболизмом и долголетием. COQ7 участвует в биосинтезе коэнзима Q, а снижение экспрессии *Mclk1/Coq7* у мышей сопровождается изменениями митохондриальной функции и увеличением продолжительности жизни [260]. Отдельного внимания заслуживает *RESF1*, для двух вариантов которого анализ с помощью PolyPhen-2 позволил предсказать потенциально повреждающее действие: p.Ala1003Thr (0,991) и p.His1244Asn (0,906). Несмотря на сравнительно невысокую консервативность соответствующих аминокислотных позиций, *RESF1* представляет интерес в контексте репродуктивной функции. Показано, что инактивация *Resf1* снижает эффективность дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши в клетки, подобные примордиальным половым клеткам, *in vitro* [261], а у мышей с нокаутом *Resf1* наблюдается бесплодие [262]. Для VGLL4, который кодируется

одноименным геном, показано участие в регуляции пролиферации, апоптоза и стероидогенеза гранулезных клеток фолликулов яичника курицы [263].

Дополнительно было проведено сопоставление функционально приоритетных миссенс-вариантов с кандидатными геномными регионами, потенциально находящимися под действием отбора, выявленными при сравнении самок с репродуктивным долголетием и контрольных фермерских самок. В результате было найдено, что варианты *COQ7* p.(Ser36Thr) и *VGLL4* p.(Arg85His) были локализованы в таких регионах. В кандидатный регион также попадал второй миссенс-вариант гена *COQ7* – p.Val79Ile, который по результатам PolyPhen-2 был классифицирован как нейтральный (benign).

Также была оценена частота альтернативных аллелей функционально приоритетных миссенс-вариантов у диких соболей. Особый интерес представляет *VGLL4* p.(Arg85His): альтернативный аллель не был обнаружен ни у контрольных фермерских, ни у диких животных, тогда как у самок с репродуктивным долголетием его частота составляет 0,375. Для *COQ7* p.(Ser36Thr) частота альтернативного аллеля у самок с репродуктивным долголетием составляет 0,438, у контрольных фермерских – 0,083, а у диких самок этот аллель не выявлен. Для двух вариантов *ASPM* p.(Arg1940Ser) и p.(Gln2900Arg) частота альтернативного аллеля у самок с репродуктивным долголетием составляет 0,50, при его отсутствии у контрольных фермерских самок и меньшей частоте у диких – 0,091 и 0,15 соответственно.

Дополнительный анализ распределения миссенс-вариантов по хозяйствам показал, что альтернативные аллели всех 14 вариантов встречались у исследуемых самок как из хозяйства «Русский соболь», так и из хозяйства «Салтыковский» (Таблица Г.5). При сравнении внутри хозяйства «Русский соболь» частоты альтернативных аллелей всех этих вариантов были выше у четырёх исследуемых самок, чем у семи контрольных.

При интерпретации полученных результатов следует учитывать особенности формирования исследуемых групп. В отличие от большинства популяционно-генетических исследований количественных репродуктивных признаков, в настоящей работе отбор исследуемых животных проводили на основании многолетних индивидуальных данных о воспроизводстве. Это позволило выделить группу самок, характеризующихся сочетанием высокой плодовитости и длительного сохранения репродуктивной функции. Вместе с тем относительно небольшое число животных с такими характеристиками ограничивает возможности статистической оценки вклада отдельных генетических вариантов в формирование исследуемого фенотипа.

Сопоставление исследуемых самок с двумя группами сравнения позволило учитывать генетические различия между животными клеточного разведения и представителями природных популяций. При этом природные популяции рассматривали прежде всего как дополнительный

источник данных о распространенности выявленных генетических вариантов. Отсутствие подробной информации о возрастной динамике репродуктивных показателей диких самок не позволяет рассматривать их как животных с противоположным репродуктивным фенотипом.

Дополнительную сложность представляет сочетание двух количественных признаков – плодовитости и продолжительности репродуктивного периода. В рамках использованного дизайна исследования невозможно однозначно определить, связан ли конкретный генетический вариант преимущественно с одним из этих признаков или одновременно с обоими. Для решения этой задачи необходим анализ более крупных выборок животных с индивидуальными данными о количестве потомства в каждом репродуктивном сезоне, возрасте последнего успешного размножения и общей продолжительности жизни.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии генетических различий между самками соболя с репродуктивным долголетием и контрольными животными, затрагивающих гены, участвующие в регуляции репродуктивной функции и процессах старения. Особый интерес представляют варианты в генах *ASPM*, *COQ7* и *VGLL4*, для которых различия частот альтернативных аллелей между исследуемыми группами сочетаются с предполагаемой функциональной значимостью. При этом, следует отметить, что наличие таких вариантов у самок с репродуктивным долголетием само по себе не свидетельствует об их непосредственном влиянии на продолжительность репродуктивного периода или плодовитость.

3.3. Эволюционно-генетические механизмы отложенной имплантации у куньих (Mustelidae)

3.3.1. Общие эволюционно ускоренные геномные регионы у куньих с отложенной имплантацией

Для исследования молекулярно-генетических особенностей отложенной имплантации сравнивали представителей отряда Хищные с наличием и отсутствием этого репродуктивного механизма. В исследуемую группу включили пять представителей семейства Куньи с отложенной имплантацией: соболя (*Martes zibellina*), канадскую выдру (*Lontra canadensis*), северного калана (*Enhydra lutris kenyoni*), горностая (*Mustela erminea*) и американскую норку *(Neogale vison, син. Neovison vison)*. В качестве фоновой группы использовали 32 вида отряда Хищные (Carnivora), включая четыре вида семейства Куньи без отложенной имплантации (см. подраздел 2.2.2 и Приложение Б, Рисунок Б.1).

На первом этапе был осуществлен поиск консервативных аутосомных регионов из геномов видов фоновой группы. Суммарно было выделено 1 406 990 консервативных аутосомных регионов длиной не менее 50 п. н. Далее для каждого из пяти исследуемых видов с отложенной имплантацией была проведена оценка наличия признаков ускоренной эволюции этих регионов. Число идентифицированных ЭУР варьировало от 3544 до 6037: у соболя было идентифицировано 6037 регионов, американской норки – 5668, канадской выдры – 4486, калана – 3935 и горностая – 3544 (Приложение Д, Таблица Д.1). Большинство ЭУР располагалось в некодирующих последовательностях, тогда как на кодирующие участки приходилось лишь 8-12 % ЭУР (Рисунок 22).

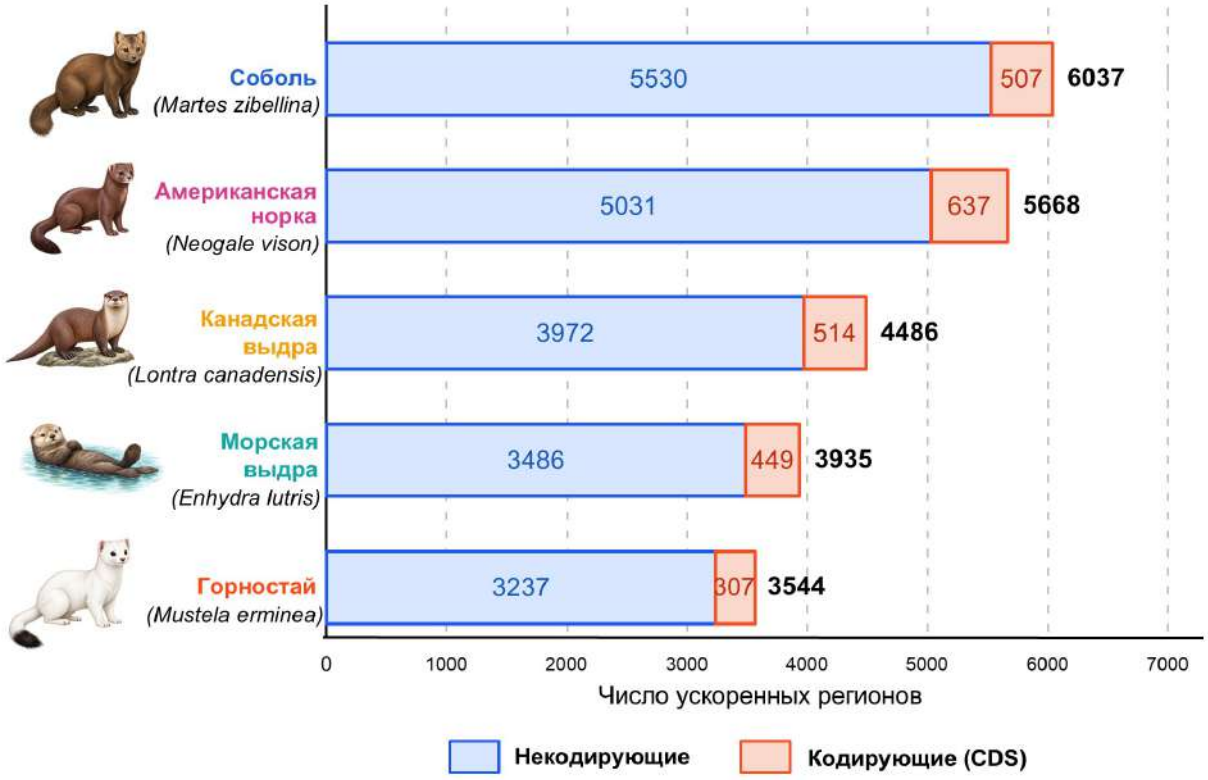


Рисунок 22 – Число ускоренных геномных регионов у пяти видов куньих с отложенной имплантацией и их распределение между кодирующими и некодирующими последовательностями

Была оценена зависимость доли ЭУР от непрерывности геномных сборок и филогенетического расстояния до ближайшего фонового вида. Выявлена отрицательная зависимость доли ЭУР как от N50 скаффолдов ($R^2 = 0{,}932$, $p = 0{,}0078$, FDR = 0,0466), так и от филогенетического расстояния до ближайшего фонового вида ($R^2 = 0{,}830$, $p = 0{,}0314$, FDR = 0,0941). Однако после поправки на множественное тестирование статистическая значимость сохранялась только для зависимости от N50. Для исключения возможного влияния артефактов выравнивания на полученные результаты была проведена визуальная проверка множественных

выравниваний приоритетных кандидатных регионов с особым вниманием к пропускам в последовательностях и неоднозначному сопоставлению ортологичных участков.

Для выявления общих геномных регионов, потенциально связанных с отложенной имплантацией, сопоставили координаты ЭУР между исследуемыми видами. Регионов, характеризующихся ускоренной эволюцией у всех пяти видов, выявлено не было. В связи с этим для дальнейшего анализа был сформирован набор из 59 ЭУР, демонстрирующих признаки ускоренной эволюции не менее чем у трех из пяти исследованных видов. Пермутационный тест показал, что наблюдаемое число таких регионов статистически значимо превышало ожидаемое при случайном распределении ЭУР: 59 против 0,1 в среднем ($p_{perm} \approx 10^{-6}$).

Выявление одних и тех же ускоренных участков у нескольких видов могло быть связано как с общим фенотипом, так и с филогенетическим родством исследованных видов. Поэтому для общих ЭУР дополнительно сравнили нуклеотидную дивергенцию ортологичных последовательностей у пяти видов куньих с отложенной имплантацией и четырех близкородственных видов без нее относительно консенсуса, построенного по 32 видам внешней группы. Средняя дивергенция этих регионов у видов с отложенной имплантацией была примерно в 2,2 раза выше, чем у видов без нее. В контрольном наборе консервативных регионов различий между группами выявлено не было. Дополнительный анализ показал, что повышенная нуклеотидная дивергенция была характерна преимущественно для тех видов, у которых соответствующий регион был классифицирован как ускоренный. Это согласуется с независимым ускорением одних и тех же геномных участков в нескольких эволюционных линиях куньих.

Из 59 ЭУР, общих не менее чем для трех видов куньих с отложенной имплантацией, 38 располагались в интронах, 9 – в межгенных областях, 6 – в промоторных областях, 3 – в нетранслируемых областях и 3 – в кодирующих последовательностях. При непосредственном сопоставлении координат этих регионов с аннотацией генов человека было выявлено перекрытие с 55 генами, включая белок-кодирующие и некодирующие (Таблица Д.2). Для оценки возможной регуляторной функции выявленных ЭУР их координаты в референсном геноме человека hg38 сопоставили с кандидатными цис-регуляторными элементами из реестра ENCODE cCRE. Перекрытие с такими элементами было выявлено для 15 ЭУР, наиболее часто с дистальными энхансероподобными элементами (dELS) (Таблица Д.3). Таким образом, часть выявленных ЭУР перекрывается с участками генома человека, аннотированными как кандидатные цис-регуляторные элементы. Однако их регуляторная активность у куньих остается экспериментально неподтвержденной.

3.3.2. Аннотация генов, связанных с эволюционно ускоренными регионами у куньих, и функциональный анализ

Для каждого из пяти исследованных видов определяли белок-кодирующие гены, в регуляторных доменах которых располагался хотя бы один ЭУР в координатах референсного генома человека. Сопоставление полученных списков позволило выявить 665 генов, в регуляторных доменах которых ЭУР присутствовали у всех пяти видов, хотя сами ускоренные регионы, как правило, не совпадали по геномным координатам. Для большинства генов было характерно небольшое число ЭУР, тогда как у некоторых оно было существенно выше (Рисунок 23). Наибольшее число ЭУР отмечено для *ZC3H11B* у калана (47 ЭУР), *CALCOCO1 и HOXC13* у канадской выдры (39 ЭУР) и горностая (78 ЭУР), *RASGEF1B* у соболя (53 ЭУР) и *MEIS2 и TMCO5A* у американской норки (36 ЭУР). С учетом числа консервативных регионов, проверенных на ускорение в соответствующих регуляторных доменах, количество ЭУР для выделенных генов статистически значимо превышало ожидаемое (FDR < 0,05).

Среди перечисленных генов особого внимания заслуживает *CALCOCO1*. Экспериментально показано, что кодируемый им белок взаимодействует с коактиваторами семейства p160, усиливая транскрипционную активность рецепторов эстрогенов [264]. Кроме того, этот белок участвует в избирательной аутофагии эндоплазматического ретикулума, обеспечивающей удаление его компонентов при клеточном стрессе [265]. Установленные функции *CALCOCO1* позволяют рассматривать его в качестве кандидата, потенциально связанного с гормональной регуляцией и поддержанием клеточного гомеостаза.

Ген *RASGEF1B* кодирует фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, специфичный в отношении малой ГТФазы Rap2 [266]. Ген *MEIS2* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в эмбриональном развитии. У мышей его инактивация приводит к нарушениям развития производных нервного гребня и гибели эмбрионов на 13-14-е сутки развития [267].

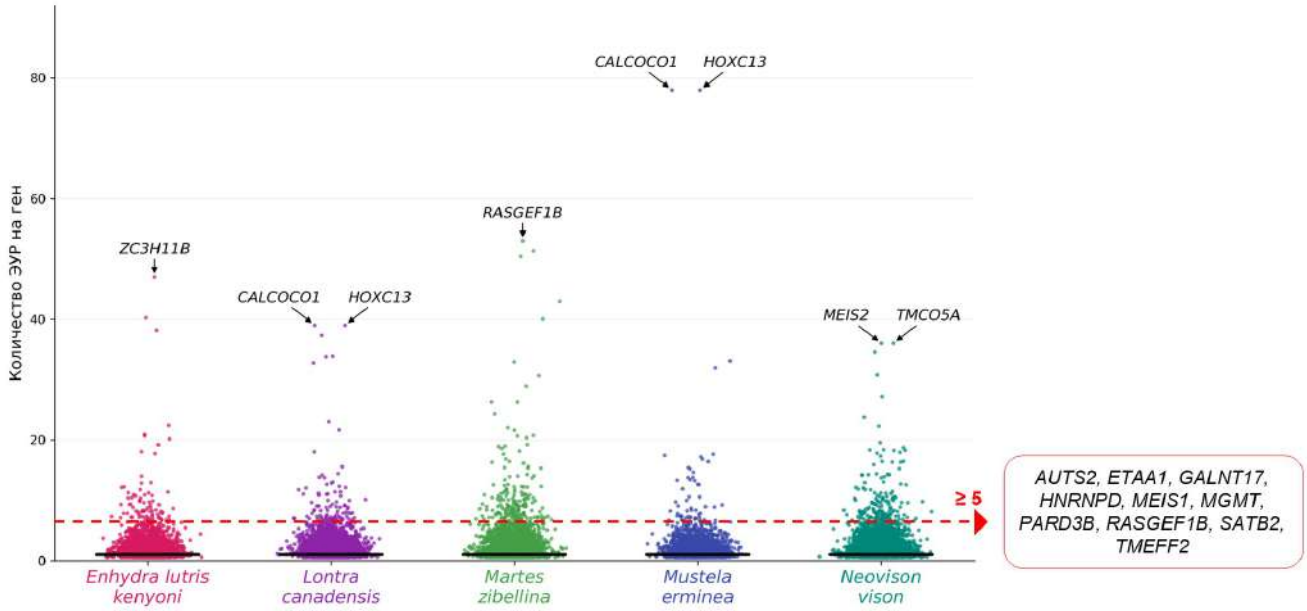


Рисунок 23 – Распределение числа эволюционно ускоренных регионов в регуляторных доменах генов у куньих с отложенной имплантацией. Каждая точка соответствует отдельному гену. Стрелками отмечены гены с наибольшим числом ЭУР у каждого вида. Справа представлены десять генов, в регуляторных доменах которых у каждого из пяти исследуемых видов выявлено не менее пяти ЭУР

Функциональный анализ 665 генов в терминах генной онтологии показал обогащение категориями, связанными с эмбриональным развитием, клеточной и межклеточной адгезией, организацией межклеточных контактов, эпителиально-мезенхимным переходом и развитием репродуктивной системы (Рисунок Д.1). Кроме того, были найдены обогащения в категориях, связанные с сигнальным путем WNT, со связыванием β-катенина, регуляцией плюрипотентности стволовых клеток и сигнальным путем Hippo. Выявленные функциональные категории согласуются с комплексным характером отложенной имплантации, включающей поддержание жизнеспособности бластоцисты, изменение функционального состояния матки и последующий переход к имплантации. В этом контексте особый интерес представляют процессы клеточной адгезии и межклеточных взаимодействий, а также сигнальный путь WNT, участвующие в развитии предимплантационного эмбриона и формировании рецептивного состояния эндометрия [268]. Отдельного внимания заслуживал сигнальный путь Hippo. В экспериментальной модели эмбриональной диапаузы у мыши показано, что поддержание жизнеспособности покоящегося эмбриона и его последующая реактивация связаны с интегрин-зависимой активацией YAP/TAZ [269]. Кроме того, эффекторы сигнального пути Hippo YAP1 и WWTR1 необходимы для нормальной децидуализации и рецептивности эндометрия: нарушение их функции у мышей сопровождалось снижением рецептивности эндометрия и задержкой имплантации [270]. Таким образом, представленность сигнального пути Hippo в

функциональном анализе согласуется с его участием как в поддержании состояния эмбриональной диапаузы, так и в подготовке матки к последующей имплантации.

Дополнительно для 59 ЭУР, общих не менее чем для трех исследованных видов, определяли гены, непосредственно перекрывающиеся с этими регионами, а также гены, в регуляторных доменах которых они располагались. Было выявлено 55 и 93 гена соответственно (Таблица Д.2). После объединения этих результатов с ранее полученным списком из 665 генов и исключения повторяющихся записей итоговый набор составил 753 уникальных генов. Наиболее интересные гены-кандидаты из этого набора генов рассмотрены в подразделе 3.3.3.

3.3.3. Кандидатные гены, ассоциированные с отложенной имплантацией

Отложенная имплантация у куньих включает несколько взаимосвязанных процессов, среди которых сезонная нейроэндокринная регуляция репродуктивного цикла, подготовка эндометрия к имплантации и возобновление развития бластоцисты. С учетом этих процессов среди генов, выявленных при аннотации эволюционно ускоренных регионов, были выделены кандидаты, потенциально связанные с регуляцией репродуктивной функции (Рисунок 24).

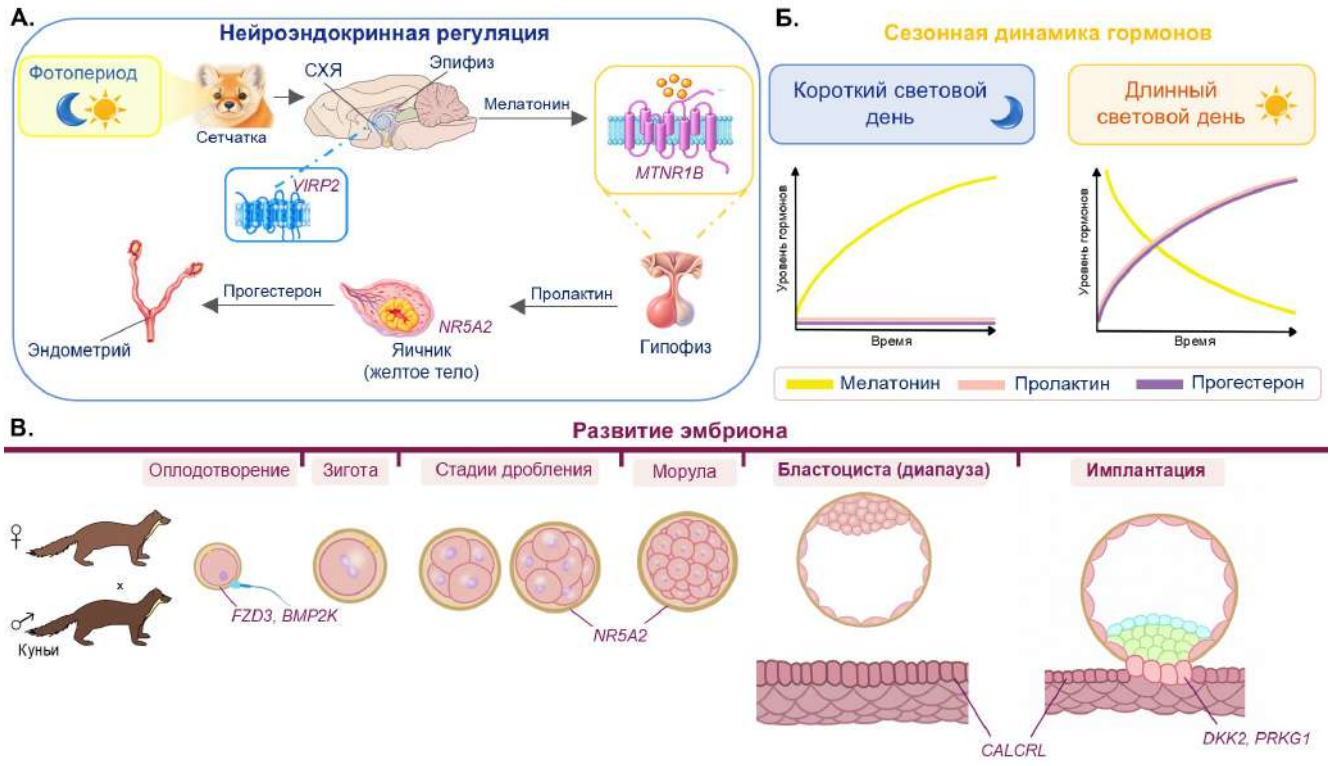


Рисунок 24 – Схематическое представление механизмов регуляции эмбриональной диапаузы и имплантации у куньих и предполагаемой функциональной связи выявленных кандидатных генов с нейроэндокринной регуляцией, ранним эмбриональным развитием и имплантацией: А – нейроэндокринная регуляция репродуктивного цикла; Б – сезонная динамика уровней

мелатонина, пролактина и прогестерона при различной продолжительности светового дня; В – основные этапы раннего эмбрионального развития и имплантации с указанием кандидатных генов, связанных с выявленными эволюционно ускоренными регионами

Важную роль в сезонной регуляции размножения куньих играет мелатонин. У американской норки продолжительность периода до имплантации определяется фотопериодом посредством изменений секреции мелатонина и пролактина. Повышение концентрации пролактина связано с реактивацией желтого тела, усилением продукции прогестерона и последующей имплантацией [75,247]. В этом контексте особый интерес представляет ген *MTNR1B*, кодирующий рецептор мелатонина MT2. Его потенциальная значимость не ограничивается нейроэндокринной регуляцией, поскольку у мышей также показана роль мелатониновой системы эндометрия и рецептора MT2 в обеспечении рецептивности эндометрия и ранней имплантации [271].

Помимо гормональной регуляции, успешная имплантация требует подготовки материнских тканей и формирования условий для взаимодействия эндометрия с бластоцистой. С этими процессами потенциально связан ген *CALCRL*, в регуляторном домене которого у нескольких исследованных видов были выявлены эволюционно ускоренные регионы. *CALCRL* кодирует кальцитонин-рецептор-подобный белок, входящий в состав рецептора адреномедуллина. Система адреномедуллина участвует в формировании рецептивности эндометрия, сосудистой перестройке матки и имплантации. Снижение ее активности у мышей сопровождается нарушением имплантации и снижением фертильности [246]. Кроме того, у свиней экспрессия *CALCRL* выявлена как в эндометрии, так и в эмбриональных структурах в периимплантационный период, что указывает на возможное участие рецептора, кодируемого этим геном, во взаимодействии эмбриона с материнскими тканями [272].

Подготовка эндометрия к имплантации также связана с регуляцией сигнальных путей и изменениями состояния стромальных клеток. В частности, ген *DKK2* кодирует секретируемый белок, регулирующий сигнальный путь WNT. У мышей его экспрессия выявлена в эпителии маточных желез перед имплантацией и в децидуальной ткани после нее [273]. Другим кандидатом является *PRKG1*, кодирующий цГМФ-зависимую протеинкиназу I типа, активность которой связана с децидуализацией стромальных клеток эндометрия человека [274]. Таким образом, выявленные кандидаты представляют интерес с точки зрения различных процессов, обеспечивающих подготовку материнских тканей к имплантации.

Помимо анализа известных функций генов, для части некодирующих регионов оценивали признаки потенциальной регуляторной активности с использованием аннотаций ENCODE и данных ChIP-seq по H3K4me3, ранее полученных для американской норки [80]. В области гена *BMP2K* один из ускоренных регионов перекрывался с участком, обогащенным H3K4me3.

Поскольку эти эпигеномные данные были получены для фронтальной коры, такое совпадение не позволяет судить о регуляторной активности данного региона в матке или эмбрионе. Вместе с тем оно указывает на наличие признаков потенциальной регуляторной активности соответствующего участка в исследованной ткани. Ген *BMP2K* кодирует BMP2-индуцируемую киназу, участвующую в регуляции клатрин-опосредованного эндоцитоза [275]. В транскриптомном исследовании у мышей повышенная экспрессия *Bmp2k* была выявлена в зрелых ооцитах по сравнению с ранними эмбриональными стадиями [276].

Для дальнейшей приоритизации кандидатных генов результаты сравнительно-геномного анализа сопоставили с опубликованными данными транскриптомных исследований матки [84] и яичников американской норки [80] в период эмбриональной диапаузы и после реактивации бластоцисты. Среди 753 генов, выявленных при сравнительно-геномном анализе, 60 генов совпадали с генами с дифференциальной экспрессией в матке и 25 – в яичниках (Таблицы Д.4, Д.5).

Среди 60 генов, для которых были выявлены изменения экспрессии в матке американской норки, для 38 генов наблюдалась более высокая экспрессия после реактивации бластоцисты, а для 19 – в период эмбриональной диапаузы. Для трех генов (*ATP6V1A, FUT10* и *GREB1L*) различия в экспрессии отдельных транскриптов имели противоположную направленность. При анализе транскриптомных данных яичников для 16 из 25 генов наблюдалась более высокая экспрессия после реактивации бластоцисты, а для девяти – в период диапаузы.

При сопоставлении этих двух наборов были выявлены два общих гена – *BMPR1B* и *PMFBP1*. Для *BMPR1B* повышение экспрессии после реактивации бластоцисты наблюдалось как в матке ($log_2FC = 1,21$), так и в яичниках ($log_2FC = 1,02$). Для *PMFBP1*, напротив, характерна различная направленность изменений экспрессии в исследованных тканях: в матке более высокая экспрессия наблюдалась в период диапаузы ($log_2FC = -3,27$), а в яичниках – после реактивации бластоцисты ($log_2FC = 3,59$).

Среди генов, характеризующихся изменением экспрессии после реактивации бластоцисты, также представлены компоненты системы инсулиноподобных факторов роста. В матке наблюдалось повышение экспрессии четырех транскриптов гена *IGF1*, тогда как в яичниках повышалась экспрессия гена *PAPPA*, участвующего в регуляции биодоступности инсулиноподобных факторов роста. Кроме того, в матке после реактивации бластоцисты повышалась экспрессия нескольких транскриптов генов *COL3A1* и *ALCAM*, участвующих в организации внеклеточного матрикса и межклеточной адгезии соответственно.

Сопоставление сравнительно-геномных и транскриптомных данных позволило дополнительно охарактеризовать кандидатные гены с учетом направленности изменений их экспрессии, тканевой специфичности и стадии репродуктивного процесса.

Среди генов, характеризующихся более высокой экспрессией в матке после реактивации бластоцисты, особый интерес представляют *ORC4, TPST1, TUSC3, VIPR2* и *FZD3*, а среди генов с повышенной экспрессией в период диапаузы – *ZSWIM2, ZNF704* и *HECTD1*.

Ген *VIPR2* потенциально связанный с нейроэндокринной регуляцией репродуктивного цикла, кодирует рецептор вазоактивного кишечного пептида, необходимый для поддержания циркадных ритмов в супрахиазматических ядрах гипоталамуса мышей [277]. В сравнительно-геномном анализе с *VIPR2* были связаны два ускоренных региона, общих для соболя, калана и американской норки. Таким образом, этот ген представляет интерес как с точки зрения возможного участия в регуляции биологических ритмов, так и на основании выявленного изменения его экспрессии в матке американской норки.

С сигнальным путем WNT, рассмотренным ранее в связи с *DKK2*, связан и ген *FZD3*, кодирующий рецептор семейства Frizzled. У мышей показана экспрессия ряда компонентов этого сигнального пути, включая рецепторы семейства Frizzled, в ооцитах и доимплантационных эмбрионах [278]. В нашем исследовании ЭУР были выявлены в регуляторном домене *FZD3* у всех пяти видов.

Репродуктивные последствия нарушения функции установлены и для *TPST1*, кодирующего тирозилпротеинсульфотрансферазу 1, участвующую в сульфатировании белков. У самок мышей с инактивированным *Tpst1* наблюдалось снижение числа детенышей в помете вследствие повышенной гибели эмбрионов после имплантации [279].

Наряду с генами, связанными с гормональной регуляцией и имплантацией, среди 60 генов-кандидатов был выявлен *ORC4*, участвующий в инициации репликации ДНК. Этот ген кодирует субъединицу комплекса распознавания участков начала репликации. Экспериментально показано, что нарушение его функции в ооцитах мыши приводит к нарушениям мейотического созревания и блокированию репликации ДНК в зиготе [280].

Сопоставление 753 генов, выявленных при сравнительно-геномном анализе с дифференциально экспрессирующимися генами яичников в период эмбриональной диапаузы и после реактивации бластоцисты также позволило выделить ряд кандидатных генов. В частности, в исследовании Fan et al. [80] показано повышение экспрессии *NR5A2* в яичниках американской норки после реактивации бластоцисты. *NR5A2* кодирует ядерный рецептор, участвующий в регуляции стероидогенеза. У мышей со снижением активности *Nr5a2* выявлены нарушения функции желтого тела и снижение продукции прогестерона [281]. Кроме того, экспериментально установлена роль *Nr5a2* в раннем эмбриональном развитии: его инактивация нарушает регуляцию экспрессии генов на 4-8-клеточной стадии и приводит к остановке развития эмбриона на стадии морулы [282].

Таким образом, анализ выявленных ЭУР с учетом известных функций генов и опубликованных транскриптомных данных позволил выделить ряд генов-кандидатов, потенциально связанных с различными процессами репродуктивного цикла и имплантации. Особый интерес представляют гены *ORC4, TPST1, TUSC3, VIPR2, FZD3, ZSWIM2, ZNF704* и *HECTD1,* выделенные по результатам аннотации ЭУР, для которых в опубликованных исследованиях также была показана дифференциальная экспрессия в матке и яичниках американской норки при переходе от эмбриональной диапаузы к реактивации бластоцисты.

3.4. Молекулярно-генетические причины нарушений репродуктивной функции при патологии ооцитов у человека

Сохранение репродуктивной функции зависит не только от продолжительности репродуктивного периода, но и от молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих созревание функционально полноценных ооцитов, их оплодотворение и раннее эмбриональное развитие. Изучение генетических причин нарушений этих процессов дополняет сравнительно-геномные исследования репродуктивного долголетия и позволяет рассмотреть отдельные механизмы реализации репродуктивной функции у человека.

Для выявления генетических причин нарушений репродуктивной функции проведено молекулярно-генетическое исследование двух пациенток с первичным бесплодием, у одной из которых наблюдалась остановка созревания ооцитов, а у другой – аномальная морфология блестящей оболочки. Клиническая и эмбриологическая характеристики пациенток приведены в подразделе 2.4.1.

3.4.1. Вариант TUBB8 p.(Ser176Leu) при остановке созревания ооцитов

У пациентки № 1 с первичным бесплодием и полной остановкой созревания ооцитов на стадии метафазы I было проведено полногеномное секвенирование. Средняя глубина покрытия составила 19,78×. После фильтрации редких кодирующих вариантов с частотой аллеля менее 0,01 по данным gnomAD для дальнейшего анализа были отобраны семь миссенс-вариантов в семи генах (Приложение Е, Таблица Е.1). Их потенциальную связь с остановкой созревания ооцитов оценивали на основании литературных данных.

Отдельного внимания заслуживает выявленный в гомозиготном состоянии вариант c.4243G>A (p.Asp1415Asn) гена *VPS13D*, участвующего в поддержании структуры и функции митохондрий [283]. Однако в базе ClinVar для данного варианта преобладают оценки доброкачественности, а его связь с остановкой созревания ооцитов не установлена (ClinVar VCV000692324).

Среди выявленных вариантов особое внимание было уделено редкому варианту c.527C>T (rs869025609) в гене *TUBB8*, приводящему к аминокислотной замене p.(Ser176Leu). Данная аминокислотная замена была описана ранее и затрагивает консервативный GTPase-домен семейства Tubulin/FtsZ, участвующий в сборке α/β-тубулинового гетеродимера. Нарушение организации микротрубочек и формирования мейотического веретена рассматривается как возможный механизм связанного с вариантами *TUBB8* нарушения созревания ооцитов [88].

Для подтверждения варианта rs869025609 в гене *TUBB8* было проведено секвенирование по Сэнгеру образцов ДНК пациентки, ее родителей и сестры. Согласно анализу, для пациентки и ее отца было установлено гетерозиготное состояние локуса *TUBB8* c.527C>T (Рисунок 25).

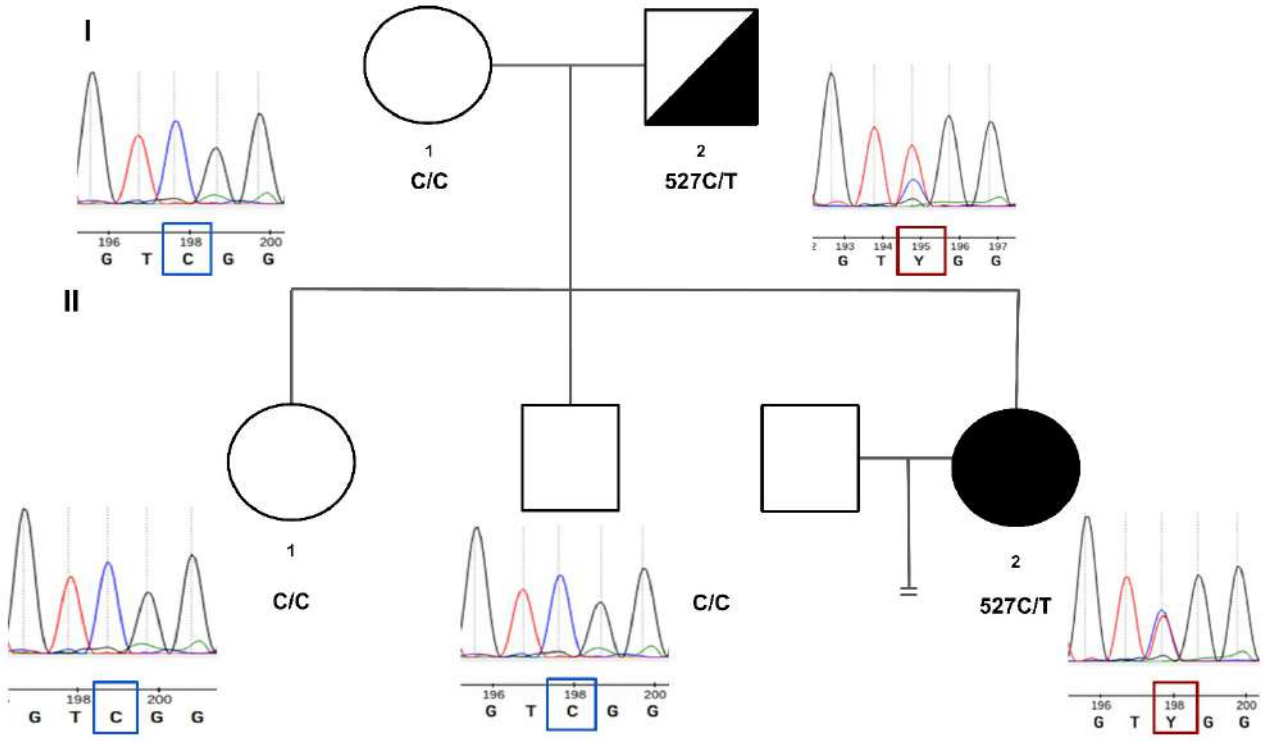


Рисунок 25 – Результаты секвенирования по Сэнгеру пробанда и членов ее семьи для варианта *TUBB8* c.527C>T (p.(Ser176Leu))

Совокупность клинических и молекулярно-генетических данных позволила рассматривать вариант *TUBB8* p.(Ser176Leu) как наиболее вероятную генетическую причину остановки созревания ооцитов у обследованной пациентки. Ген *TUBB8* кодирует β-тубулин, специфичный для приматов, который экспрессируется в ооцитах и на ранних стадиях

эмбрионального развития и входит в состав микротрубочек, необходимых для формирования мейотического веретена. Патогенные варианты *TUBB8* могут нарушать сворачивание и сборку α/β-тубулинового гетеродимера, приводя к дефектам микротрубочек и остановке созревания ооцитов. Для гетерозиготных патогенных вариантов *TUBB8* наиболее характерна остановка созревания на стадии метафазы I, хотя описаны также нарушения оплодотворения и раннего эмбрионального развития. Данный вариант был унаследован от отца, однако у него отсутствуют какие-либо негативные проявления, так как *TUBB8* не экспрессируется в мужских половых клетках. Согласно литературным данным, экспрессия *TUBB8* ограничивается исключительно ооцитами и эмбрионами, где он составляет значительную часть экспрессируемого β-тубулина, ключевого компонента микротрубочек.

Аминокислотный остаток Ser176 расположен в области продольного контакта между соседними гетеродимерами тубулина, где β-тубулин одного гетеродимера взаимодействует с α-тубулином следующего (Рисунок 26). Такое расположение позволяет предположить, что замена Ser176Leu может нарушать взаимодействие соседних гетеродимеров и препятствовать нормальной сборке микротрубочек [88].

Вариант *TUBB8* p.(Ser176Leu) ранее был описан у пациентки с остановкой созревания ооцитов в китайской популяции, при этом его патогенное действие было подтверждено экспериментально [88]. В настоящем исследовании, насколько известно автору, данный вариант впервые описан у пациентки с аналогичным репродуктивным фенотипом в России. В отличие от ранее описанного случая возникновения варианта *de novo*, в настоящей работе установлено его наследование по отцовской линии.

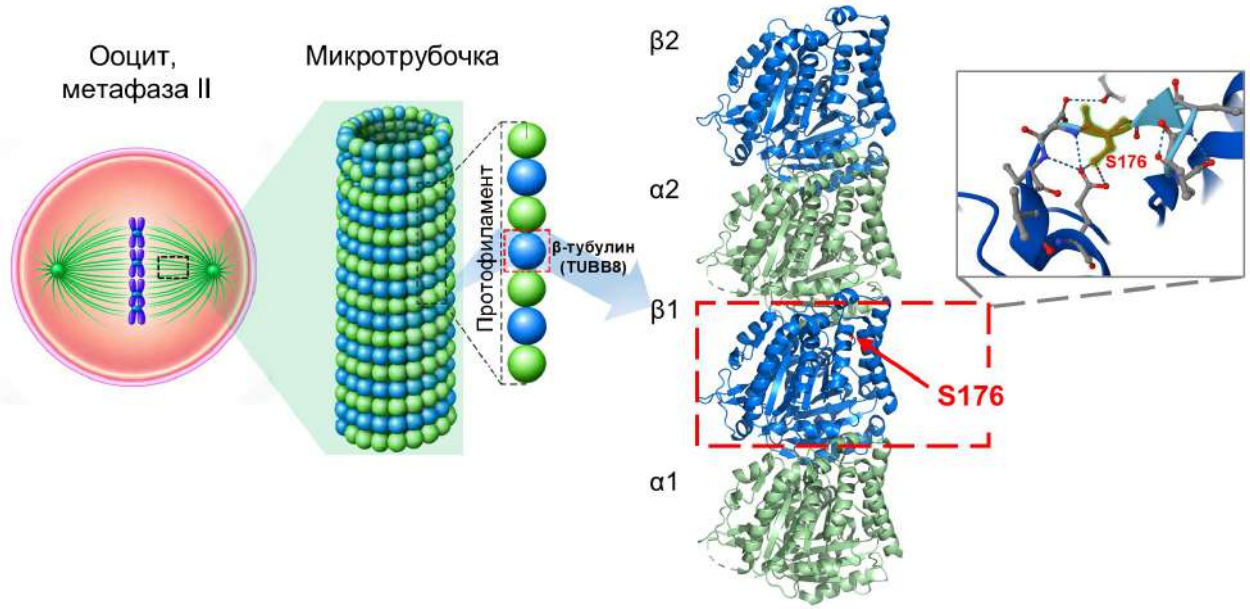


Рисунок 26 – Положение аминокислотного остатка Ser176 в структуре β-тубулина TUBB8, предсказанной с помощью AlphaFold 3. Участок локализации аминокислотного остатка Ser176 показан в увеличенном масштабе

3.4.2. Вариант ZP4 p.(Leu342Pro) у пациентки с аномальной структурой блестящей оболочки

Средняя глубина покрытия полногеномного секвенирования пациентки № 2 составила около 19×. После фильтрации редких кодирующих вариантов с частотой менее 0,01 по gnomAD у пациентки был выявлен редкий гетерозиготный миссенс-вариант в гене *ZP4*: chr1:238048826 A>G (rs1254095560), приводящий к аминокислотной замене p.(Leu342Pro) (Таблица Е.2).

Несмотря на наличие сведений о данном генетическом варианте в популяционных базах данных, в доступной научной литературе ранее не было описано его выявление у пациенток с нарушениями репродуктивной функции. Вместе с тем для других миссенс-вариантов гена *ZP4* ранее была установлена связь с женским бесплодием и аномальной морфологией блестящей оболочки ооцитов [288]. Таким образом, полученные результаты расширяют спектр кандидатных генетических вариантов *ZP4*, потенциально значимых для формирования блестящей оболочки ооцитов.

Блестящая оболочка участвует в росте и созревании ооцита, фолликулогенезе, оплодотворении и ранних этапах эмбрионального развития [284]. Одним из ее компонентов у человека является ZP4 – гликопротеин с ооцит-специфичной экспрессией [177,285]. Функции ZP4 связаны как со взаимодействием ооцита со сперматозоидом и индукцией акросомной реакции [284,286], так и со структурной организацией самой блестящей оболочки. ZP4, наряду с ZP1, рассматривается как структурный компонент, стабилизирующий фибриллярный каркас блестящей оболочки, образованный белками ZP2/ZP3 [287]. Значимость ZP4 для формирования нормальной ZP подтверждается и клиническими данными: гетерозиготные варианты *ZP4* ранее были описаны у пациенток с бесплодием и аномальной блестящей оболочкой, а функциональные эксперименты показали снижение секреции мутантного белка в экспериментах *in vitro* [288]. Это позволяет рассматривать нарушение секреции или структуры ZP4 как один из возможных механизмов формирования дефектов блестящей оболочки у человека.

Замена p.(Leu342Pro) затрагивает ZP-C субдомен белка ZP4, входящий в состав консервативного ZP-домена, который участвует в полимеризации ZP-белков и формировании фибриллярного матрикса блестящей оболочки [287] (Рисунок 27А). Позиция Leu342 находится в эволюционно консервативной аминокислотной позиции, что подтверждается множественным выравниванием последовательностей ZP4 у позвоночных (Рисунок 27Б). Замена лейцина на пролин в консервативной позиции может нарушать локальную вторичную структуру белка, поскольку пролин ограничивает конформационную подвижность полипептидной цепи [289].

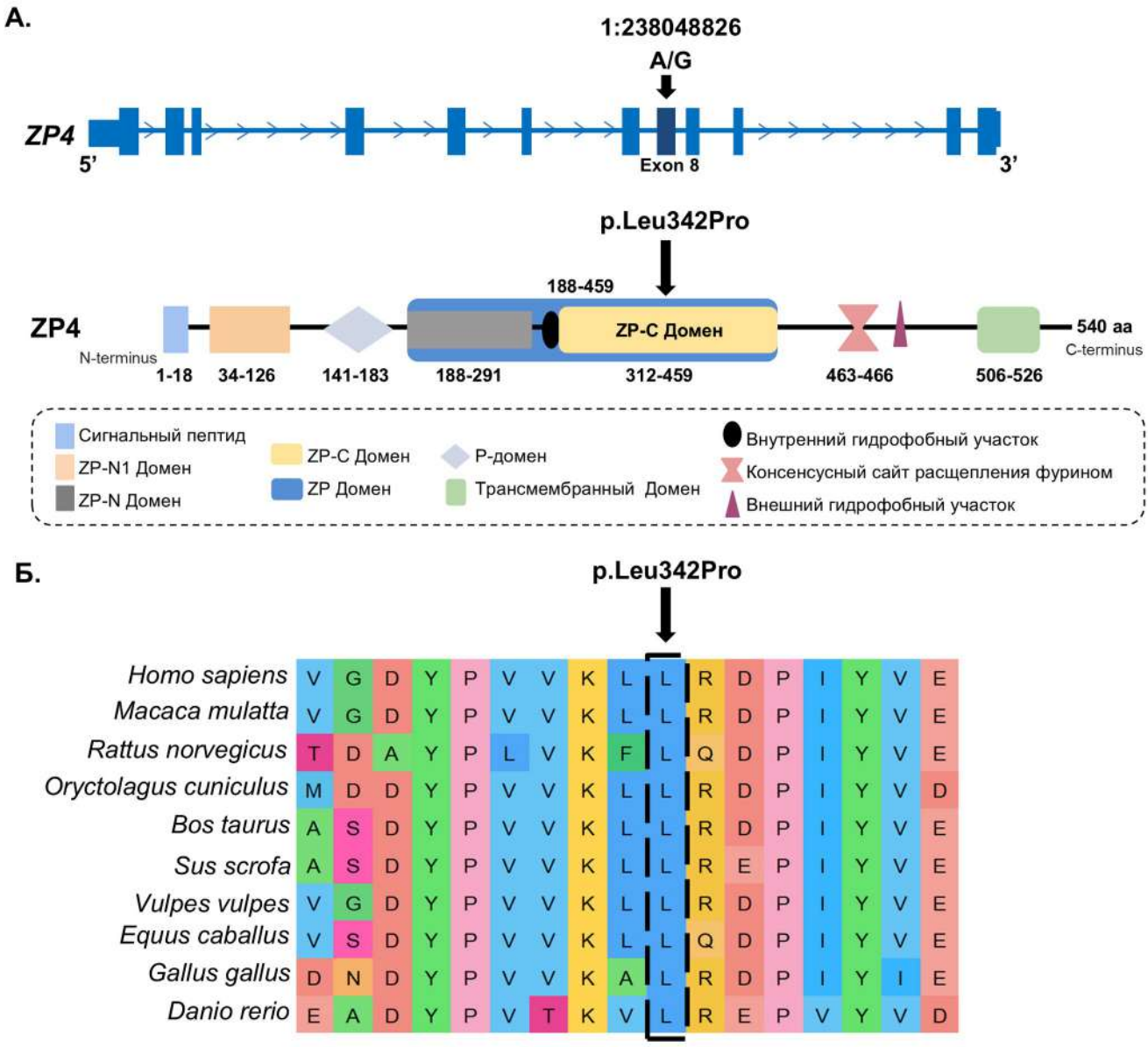


Рисунок 27 – Локализация варианта ZP4 p.(Leu342Pro) в структуре гена и белка.
А – расположение варианта chr1:238048826 A/G в 8-м экзоне *ZP4* и проекция замены L342P на доменную структуру белка; Б – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ZP4 у позвоночных, демонстрирующее консервативность позиции Leu342

Для оценки возможного структурного эффекта p.(Leu342Pro) было выполнено моделирование референсного белка ZP4 и варианта с аминокислотной заменой (Рисунок 28). В модели замена лейцина на пролин сопровождалась изменением локальной пространственной организации белка (Рисунок 28Б). Наблюдаемое расхождение структурных фрагментов может указывать на потенциально дестабилизирующее действие p.(Leu342Pro) на третичную структуру ZP4. В совокупности эти данные поддерживают предположение о возможном влиянии p.(Leu342Pro) на укладку ZP4 и стабильность белкового матрикса ZP.

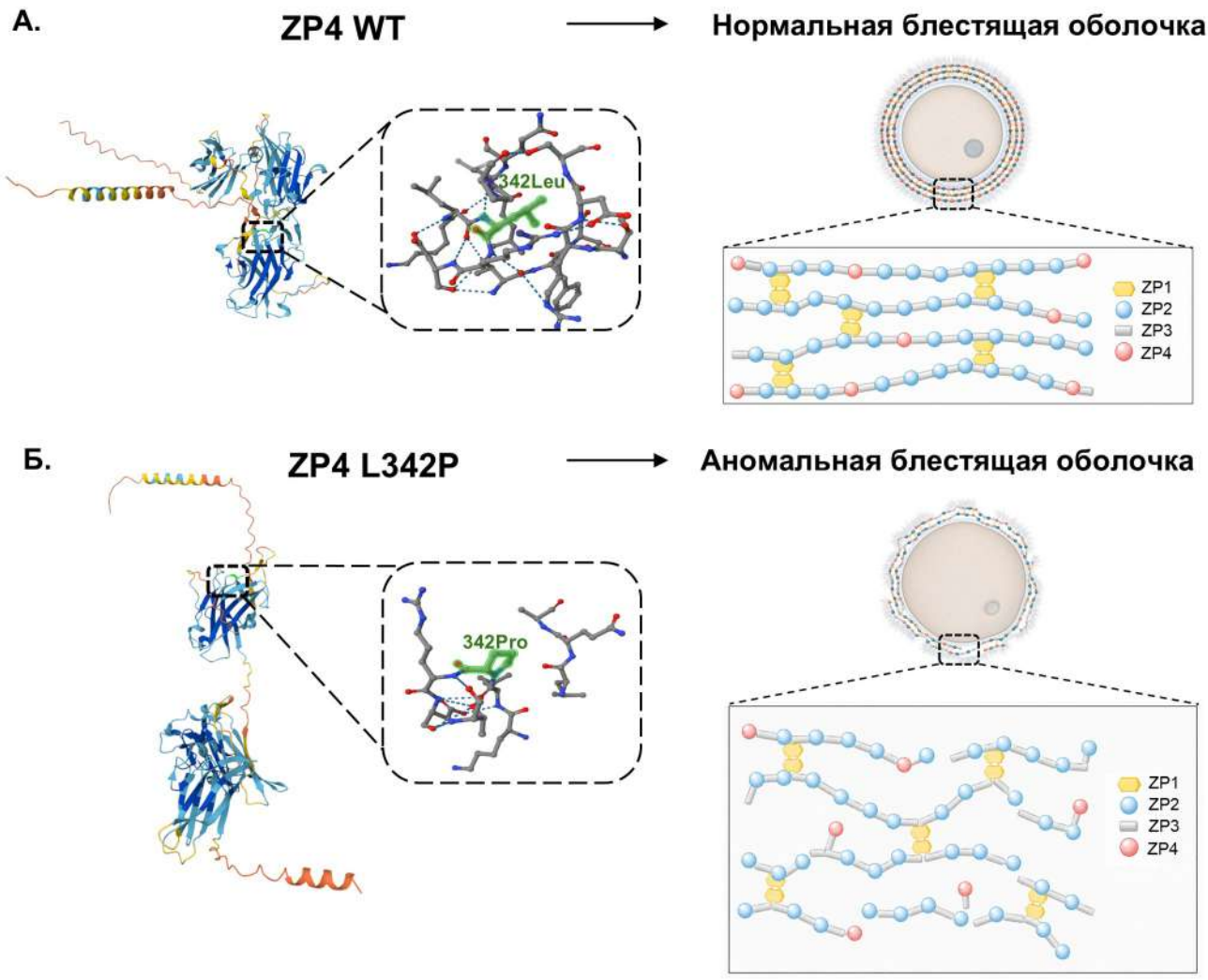


Рисунок 28 – Предполагаемое влияние аминокислотной замены p.(Leu342Pro) на пространственную структуру белка ZP4 по результатам моделирования с использованием AlphaFold 3. А – пространственная структура белка ZP4 дикого типа (WT) и схематическое изображение нормальной организации блестящей оболочки ооцита; Б – пространственная структура белка ZP4 с заменой p.(Leu342Pro) и схематическое изображение предполагаемого нарушения организации блестящей оболочки. Пунктирными рамками выделены локальное окружение аминокислотного остатка в положении 342 и участки структуры блестящей оболочки

Экспериментальные данные на ооцитах кролика дополнительно подтверждают структурную роль ZP4 в формировании ZP [290]. При отсутствии ZP4 у нокаутных по этому гену животных формировалась более тонкая, проницаемая и дезорганизованная блестящая оболочка, а развитие эмбрионов и фертильность были резко нарушены. Важно, что в этой модели у кроликов оплодотворение и развитие *in vitro* до стадии бластоцисты могли сохраняться, тогда как развитие *in vivo* было нарушено [290]. Это показывает, что ZP4 может быть важен не только для взаимодействия гамет, но и для механической стабильности и защитной функции блестящей оболочки на ранних стадиях развития.

Клинически значимым наблюдением является отсутствие оплодотворения и последующего дробления после интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). Этот факт важен для интерпретации фенотипа: ИКСИ позволяет обойти этапы связывания сперматозоида с ZP и акросомной реакции, но не устраняет возможные последствия дефекта самой блестящей оболочки, нарушения ее белкового матрикса или сниженного качества ооцита. Поэтому отсутствие оплодотворения после ИКСИ не может быть объяснено только нарушением взаимодействия сперматозоида с ZP и может указывать на наличие более широких нарушений, связанных с качеством ооцита.

Эта интерпретация согласуется с данными транскриптомных исследований, свидетельствующими об экспрессии *ZP4* на различных этапах развития ооцита и раннего эмбриона [213–215]. Для более подробной характеристики экспрессии *ZP4* был проведен анализ опубликованных транскриптомных данных трех исследований (GSE107746, GSE154762 и GSE71318). По результатам анализа экспрессия *ZP4* выявлялась на всех исследованных стадиях фолликулогенеза, включая примордиальные, первичные, вторичные, антральные и преовуляторные фолликулы (Рисунок 29А). Транскрипты *ZP4* также обнаруживались в растущих ооцитах и ооцитах, завершивших рост, а также на стадиях метафазы I и II (Рисунок 29Б). В ходе доимплантационного развития экспрессия *ZP4* определялась в ооцитах, зиготах и эмбрионах на различных стадиях дробления, а также на стадии бластоцисты (Рисунок 29В).

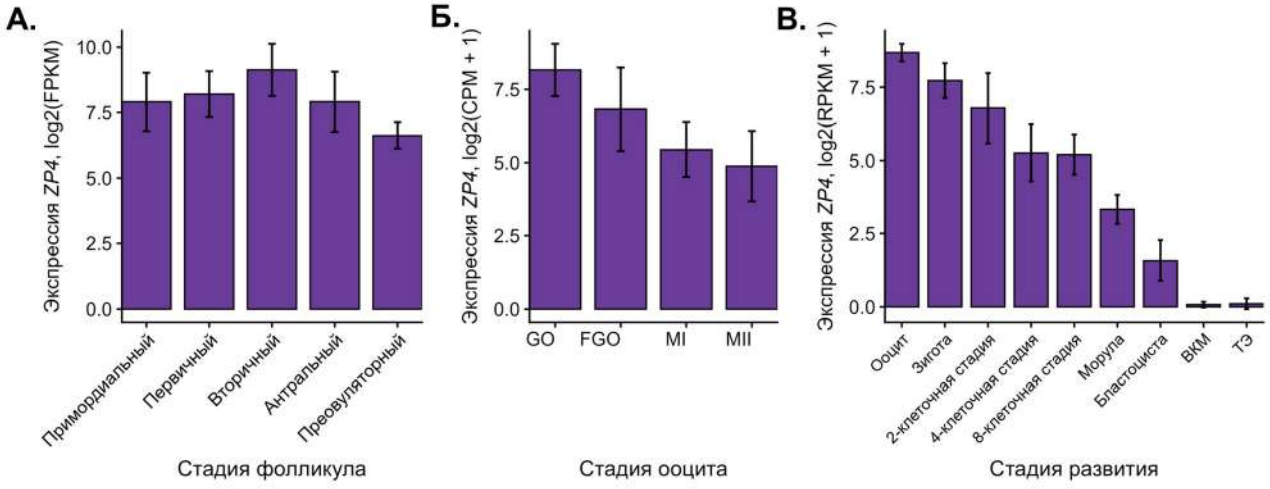


Рисунок 29 – Экспрессия ZP4 в ооцитах, фолликулогенезе и раннем эмбриональном развитии человека по опубликованным транскриптомным данным. А – экспрессия ZP4 на стадиях фолликулогенеза (GSE107746); Б – экспрессия ZP4 на стадиях созревания ооцитов (GSE154762); В – экспрессия ZP4 на стадиях доимплантационного развития (GSE71318). Столбцы отражают средние значения экспрессии, вертикальные линии – стандартные отклонения

В ранее проведенных исследованиях также описаны пациентки с аномальной морфологией блестящей оболочки, у которых анализ кодирующих последовательностей генов

ZP1–ZP4 не позволил выявить потенциально причинные варианты [291,292]. Это свидетельствует о том, что нарушения морфологии блестящей оболочки могут иметь различные молекулярно-генетические причины. Помимо изменений пространственной организации составляющих ее гликопротеинов, предполагается возможное участие нарушений цитоплазматической организации ооцитов, взаимодействия сперматозоида с ооцитом и раннего эмбрионального развития [291].

Одним из потенциальных механизмов, затрудняющих выявление генетических причин репродуктивных нарушений, может быть герминативный мозаицизм. Мутации *de novo*, возникающие в клетках-предшественниках ооцитов, могут присутствовать в части клеток зародышевой линии, но отсутствовать в периферической крови, что ограничивает возможность их обнаружения при полногеномном секвенировании ДНК, выделенной из этого биологического материала [293,294]. Кроме того, нельзя исключить возможную роль некодирующих и структурных генетических вариантов, а также нарушений регуляции экспрессии генов. Однако применительно к нарушениям морфологии блестящей оболочки роль герминативного мозаицизма остается гипотетической и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, совокупность клинических, генетических и структурных данных поддерживает возможную связь варианта *ZP4* p.(Leu342Pro) с нарушением структуры блестящей оболочки. Вместе с тем основными ограничениями исследования являются отсутствие сегрегационного анализа и функционального подтверждения влияния варианта на структуру и функцию белка ZP4. Поэтому для установления патогенной роли p.(Leu342Pro) необходимы дальнейшие функциональные исследования.

3.5. Эволюционно-генетические механизмы пострепродуктивного долголетия у зубатых китов (Odontoceti)

3.5.1. Эволюционно ускоренные геномные регионы у зубатых китов с длительным пострепродуктивным периодом

В предыдущих разделах были рассмотрены молекулярно-генетические особенности сохранения и регуляции репродуктивной функции у плацентарных млекопитающих. Отдельный интерес представляет пострепродуктивное долголетие, характеризующееся продолжительным

периодом жизни самок после прекращения размножения. Согласно сравнительному демографическому исследованию Ellis et al. [11], возникновение менопаузы у зубатых китов связано преимущественно с увеличением общей продолжительности жизни самок без соответствующего удлинения репродуктивного периода. Таким образом, зубатые киты представляют интерес для изучения молекулярно-генетических особенностей, потенциально связанных с продолжительной жизнью после завершения репродукции, а также для исследования взаимосвязи репродуктивного и соматического старения.

Для выявления молекулярно-генетических факторов, ассоциированных с пострепродуктивным долголетием, были проанализированы косатка (*Orcinus orca*), нарвал (*Monodon monoceros*) и белуха (*Delphinapterus leucas*) – три вида зубатых китов, для которых наличие менопаузы и продолжительного пострепродуктивного периода подтверждено демографическими данными. В качестве фоновой группы использовали шесть других видов парвотряда Зубатые киты (*Odontoceti*), у которых, согласно имеющимся демографическим данным, не установлено наличие менопаузы и продолжительного пострепродуктивного периода (см. Подраздел 2.2.3; Приложение Ж, Таблица Ж.1 и Ж2; Рисунок 30) [9,11].

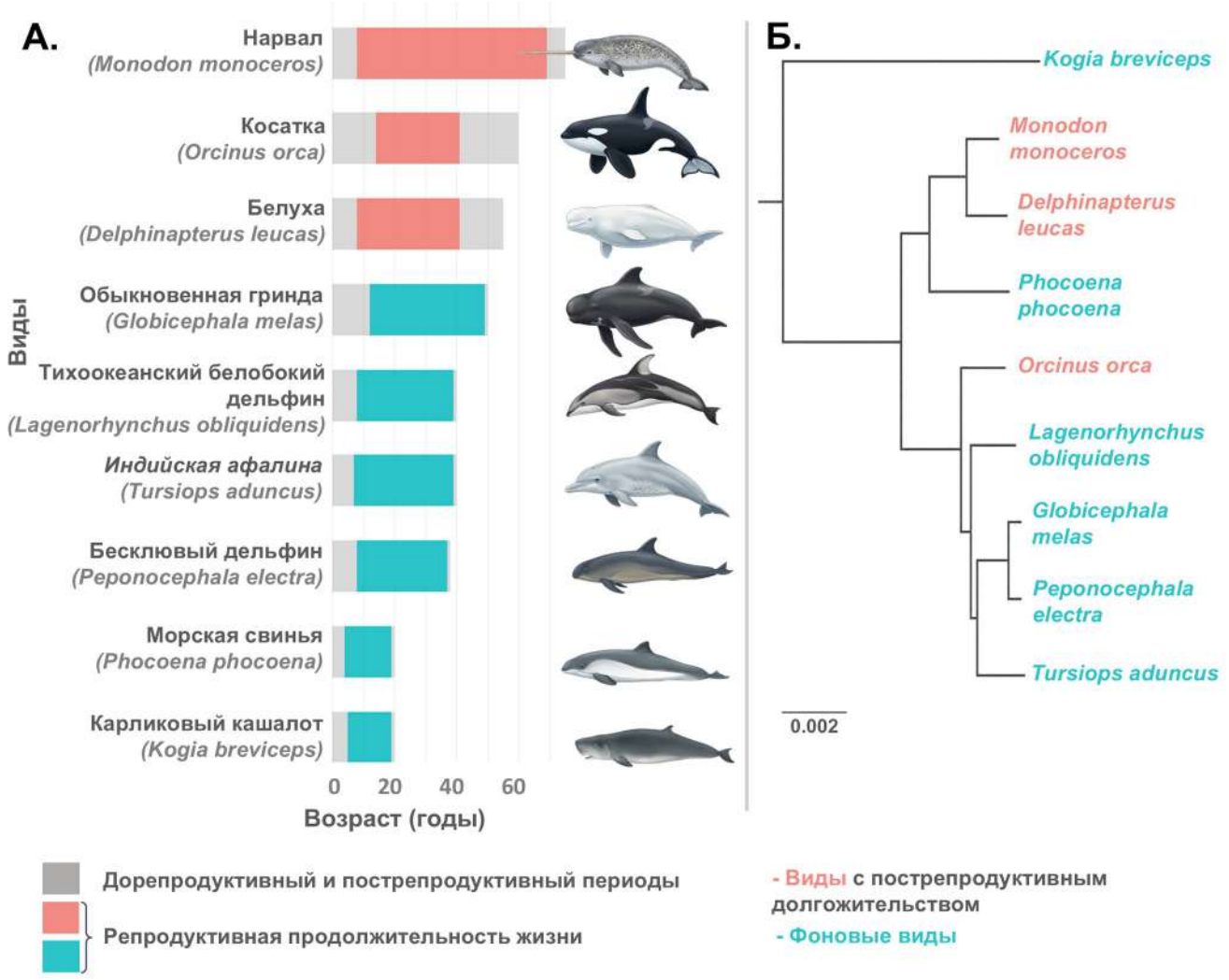


Рисунок 30 – Продолжительность репродуктивного и пострепродуктивного периодов (А) и филогенетические взаимоотношения (Б) исследованных видов зубатых китов с установленным продолжительным пострепродуктивным периодом и видов, для которых такой период не установлен

В геномах фоновых видов было определено 1 005 583 эволюционно консервативных аутосомных региона длиной не менее 50 п.н (Рисунок 31). Среди этих участков было выявлено 7591 эволюционно ускоренных региона у косатки, 5274 – у нарвала и 5352 – у белухи, что составляло соответственно 0,8, 0,5 и 0,5 % от общего числа исследованных эволюционно консервативных регионов. ЭУР были распределены по всем аутосомам без выраженной хромосомной кластеризации. При диагностическом сопоставлении доли ЭУР со значениями N50 скаффолдов выраженной зависимости не наблюдалось. Однако небольшое число исследованных видов не позволяет исключить возможное влияние качества геномных сборок на результаты выявления ЭУР.

Большинство выявленных ЭУР было видоспецифичным, вместе с тем 29 ортологичных регионов демонстрировали статистически значимое эволюционное ускорение у всех трех видов с продолжительным пострепродуктивным периодом. Пермутационный тест показал, что наблюдаемое число таких регионов статистически значимо превышало ожидаемое при случайном распределении ЭУР: 29 регионов при среднем ожидаемом числе 0,017 ($p_{perm} \approx 10^{-6}$). При попарном сравнении было выявлено 102 общих ЭУР у косатки и белухи, 112 – у косатки и нарвала 2229 – у белухи и нарвала.

При сопоставлении 29 общих ЭУР с аннотацией ортологичных участков генома человека было установлено, что большинство регионов перекрывается с аннотированными генами. Среди белок-кодирующих генов, перекрывающихся с общими ЭУР, особый интерес представляют *DNM1L* и *BIRC6*. Ген *DNM1L* кодирует белок DRP1, участвующий в делении митохондрий. Экспериментально показано, что нарушение функции DRP1 в ооцитах мышей сопровождается возраст-зависимыми нарушениями созревания фолликулов и овуляции [295]. Для *BIRC6*, белковый продукт которого участвует в регуляции апоптоза, описана связь с семейной преждевременной недостаточностью яичников, подкрепленная результатами функциональных экспериментов на модельных организмах [296].

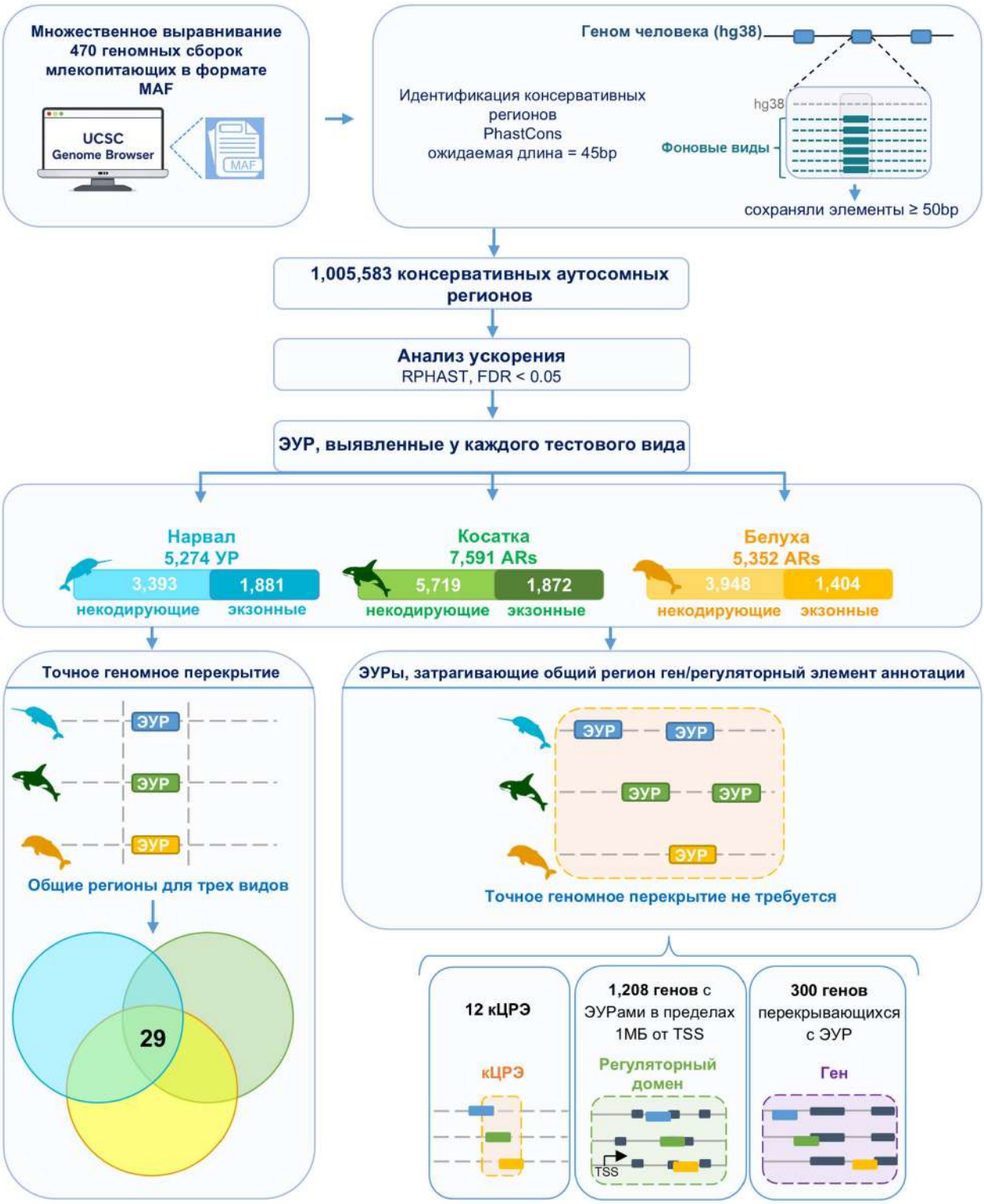


Рисунок 31 – Схема выявления эволюционно ускоренных регионов у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием и основные результаты их сравнительного анализа и геномной аннотации

Среди генов, перекрывающихся с общими ЭУР, также были выявлены *CFAP70* и *NEO1*, участвующие в мужской репродуктивной функции. Экспериментально показано, что нарушение функции *CFAP70* приводит к дефектам формирования жгутиков сперматозоидов и мужскому

бесплодию [297]. Ген *NEO1* участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки сперматогониев, что подтверждено исследованиями на мышиных моделях [298]. Дополнительный интерес представляет ген *STX8*, в пределах которого также выявлен общий ЭУР (Рисунок 32). *STX8* кодирует синтаксин-8, участвующий во внутриклеточном везикулярном транспорте. В исследованиях на мышах установлено, что STX8 является субстратом протеазы SPPL2c, участвующей в развитии мужских половых клеток. При недостаточности SPPL2c в семенниках наблюдалось накопление STX8, а также нарушения внутриклеточного транспорта и формирования акросомы сперматозоидов [299,300]. Кроме того, экспериментально показано участие STX8 в высвобождении тау-белка из клеток, что представляет интерес в контексте нейродегенеративных процессов [301].

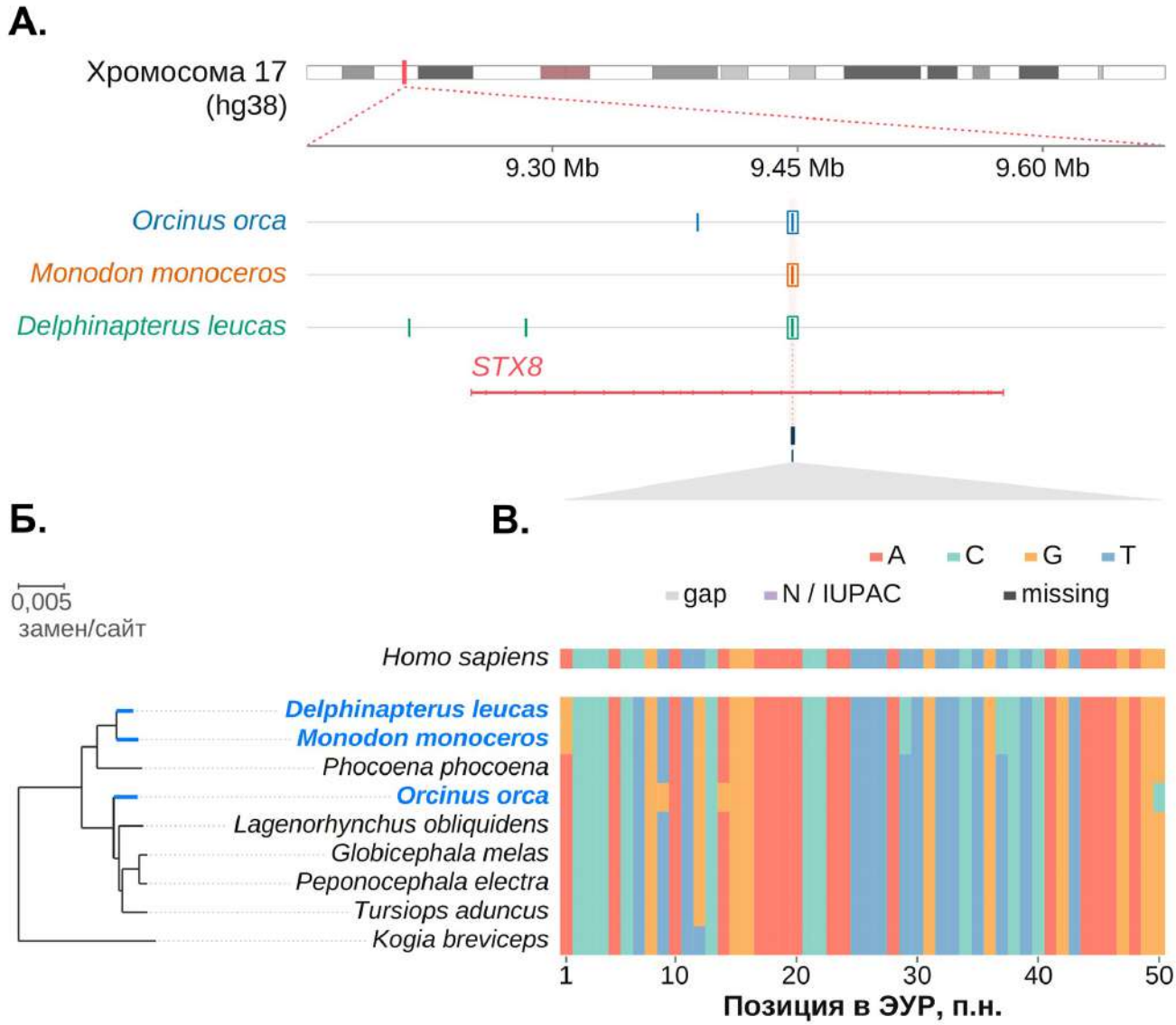
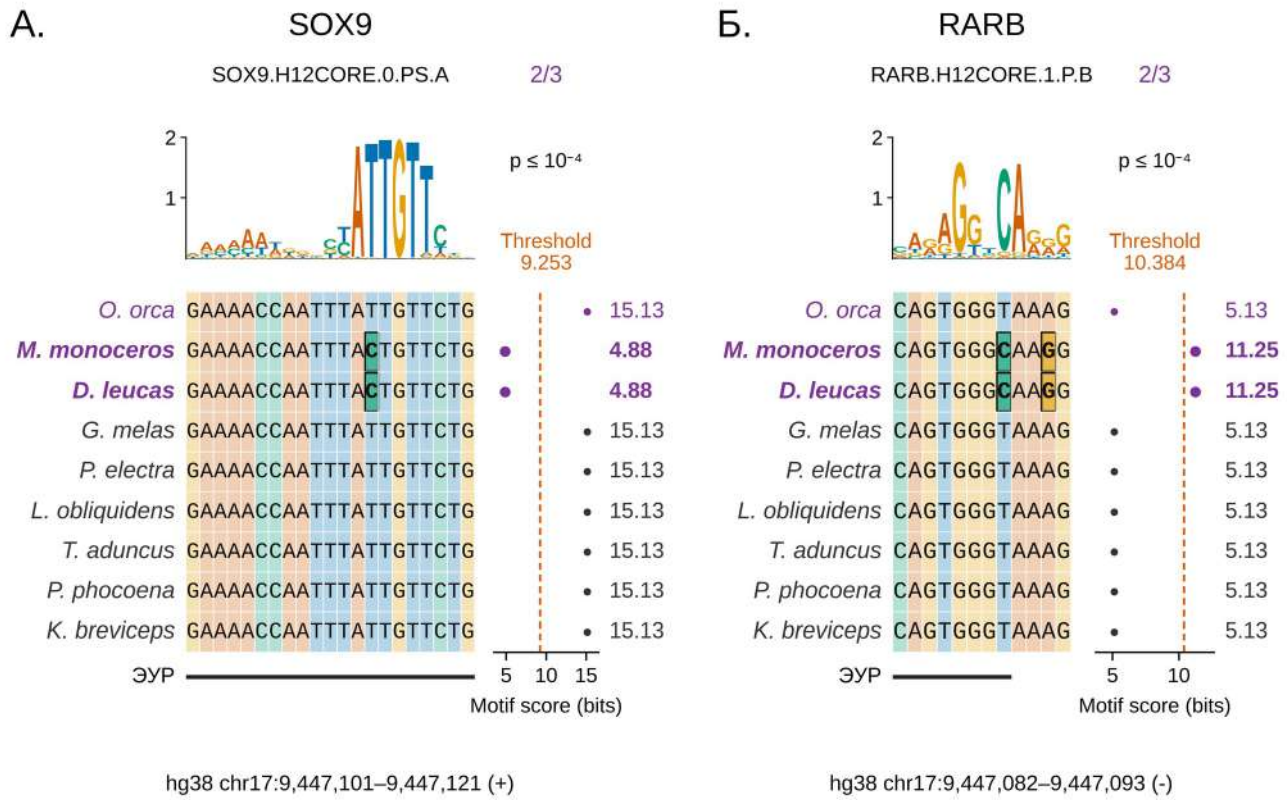


Рисунок 32 – Геномная локализация и множественное выравнивание последовательностей общего эволюционно ускоренного региона в интроне гена *STX8* у косатки, нарвала и белухи: А – расположение общего ЭУР (chr17:9 447 086–9 447 135, hg38) в гене *STX8*. Б – филогенетическое дерево исследованных видов зубатых китов. В – множественное

выравнивание нуклеотидных последовательностей общего ЭУР у исследуемых и фоновых видов с включением референсной последовательности генома человека

3.5.2. Регуляторная характеристика эволюционно ускоренных геномных регионов у зубатых китов с продолжительным пострепродуктивным периодом

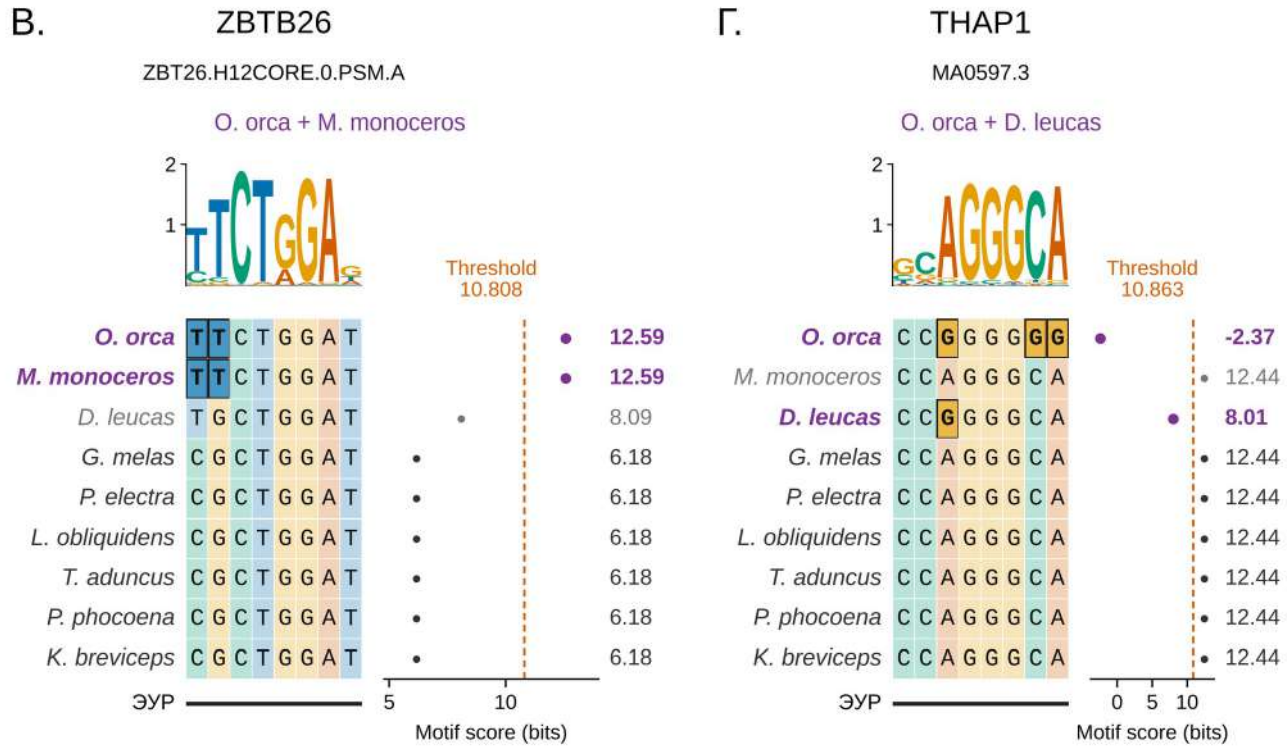
Для оценки предполагаемого регуляторного потенциала общих ЭУР анализировали изменения предсказанных сайтов связывания транскрипционных факторов у трех видов с продолжительным пострепродуктивным периодом относительно консенсусной последовательности шести фоновых видов. В 290 случаях нуклеотидные различия, затрагивающие предсказанные сайты связывания, располагались непосредственно в пределах соответствующих ЭУР у всех трех видов. Из них 34 изменения, включая 25 случаев предполагаемой утраты и 9 случаев появления сайтов связывания, были выявлены при использовании обеих баз данных мотивов транскрипционных факторов – JASPAR2024 и HOCOMOCO (Таблица Ж.3). Дополнительно были рассмотрены примеры изменений предсказанных сайтов связывания транскрипционных факторов, характерных для отдельных видов. В частности, в общем ЭУР гена *STX8*, рассмотренного в подразделе 3.5.1, у нарвала и белухи было выявлено потенциальное нарушение сайта связывания транскрипционного фактора SOX9 и потенциальное появление сайта связывания транскрипционного фактора RARB. В ЭУР гена *KRT6A*, общем для косатки и нарвала, было выявлено потенциальное появление сайта связывания транскрипционного фактора *ZBTB26*, а в ЭУР гена *GSE1*, общем для косатки и белухи, потенциального нарушения сайта связывания транскрипционного фактора THAP1 (Рисунок 33).



hg38 chr17:9,447,101–9,447,121 (+)

hg38 chr17:9,447,082–9,447,093 (-)

ЭУР chr17:9,447,086–9,447,135



hg38 chr12:52,492,716–52,492,723 (+)

ЭУР chr12:52,492,676–52,492,725

hg38 chr16:85,570,685–85,570,692 (-)

ЭУР chr16:85,570,654–85,570,703

Рисунок 33 – Примеры предсказанных изменений соответствия нуклеотидных последовательностей мотивам связывания транскрипционных факторов в эволюционно ускоренных регионах зубатых китов: А – снижение соответствия нуклеотидной последовательности мотиву связывания SOX9 и Б – повышение вероятности связывания соответствия мотиву RARB у нарвала и белухи (ЭУР, общий для трех исследуемых видов в пределах гена *STX8*). В – повышение вероятности связывания соответствия мотиву ZBTB26 у косатки и нарвала (ЭУР, расположенный в пределах гена *KRT6A*); Г – снижение соответствия нуклеотидной последовательности мотиву связывания THAP1 у косатки и белухи (ЭУР, расположенный в пределах гена *GSE1*). ЭУР, представленные на панелях В и Г, совпадают у соответствующих пар видов

Для дальнейшей оценки регуляторного потенциала ЭУР использовали опубликованные Villar et al. [168] данные ChIP-seq о распределении гистоновых модификаций H3K27ac и H3K4me3 в печени обыкновенного дельфина (*Delphinus delphis*). Сопоставление проводили на уровне координат ортологичных геномных участков. Для этого координаты участков, обогащенных H3K27ac и H3K4me3, переводили из сборки генома афалины turTru1 в координаты генома человека GRCh38/hg38 и определяли их перекрытие с выявленными ЭУР. При анализе полных видовых наборов перекрытие с указанными участками было установлено для 342 ЭУР косатки, 237 ЭУР белухи и 248 ЭУР нарвала (Таблица Ж.4). При отдельном анализе 29 общих ЭУР было выявлено четыре региона, перекрывающихся с двумя участками, обогащенными H3K4me3. Один из этих регионов располагался в области гена *DHRS4L2* (Приложение Ж, Рисунок Ж.1). Ген *DHRS4L2* входит в кластер генов DHRS4, для которого характерна сложная регуляция транскрипции. Для *DHRS4L2* описаны альтернативные транскрипты и регуляция экспрессии посредством метилирования CpG-островков [302].

В связи с ограниченностью функциональных аннотаций китообразных дальнейшую характеристику регуляторного потенциала ЭУР проводили с использованием соответствующих ортологичных участков генома человека. Анализ этих участков по данным ChIP-Atlas выявил их статистически значимое обогащение участками гиперчувствительности к ДНКазе I, являющимися маркерами открытого хроматина. Наиболее значимое обогащение наблюдалось в образцах крови и клетках иммунной системы, а также в нервной ткани и головном мозге (Рисунок 34). Кроме того, было выявлено обогащение участками, содержащими гистоновые модификации H3K27ac и H3K4me3, ассоциированные с активным хроматином (Рисунок Ж.2). При сопоставлении 29 общих ЭУР с реестром кандидатных ЦРЭ ENCODE было выявлено 10 регионов, перекрывающихся с девятью кандидатными ЦРЭ, аннотированными в геноме человека (Таблица Ж.5).

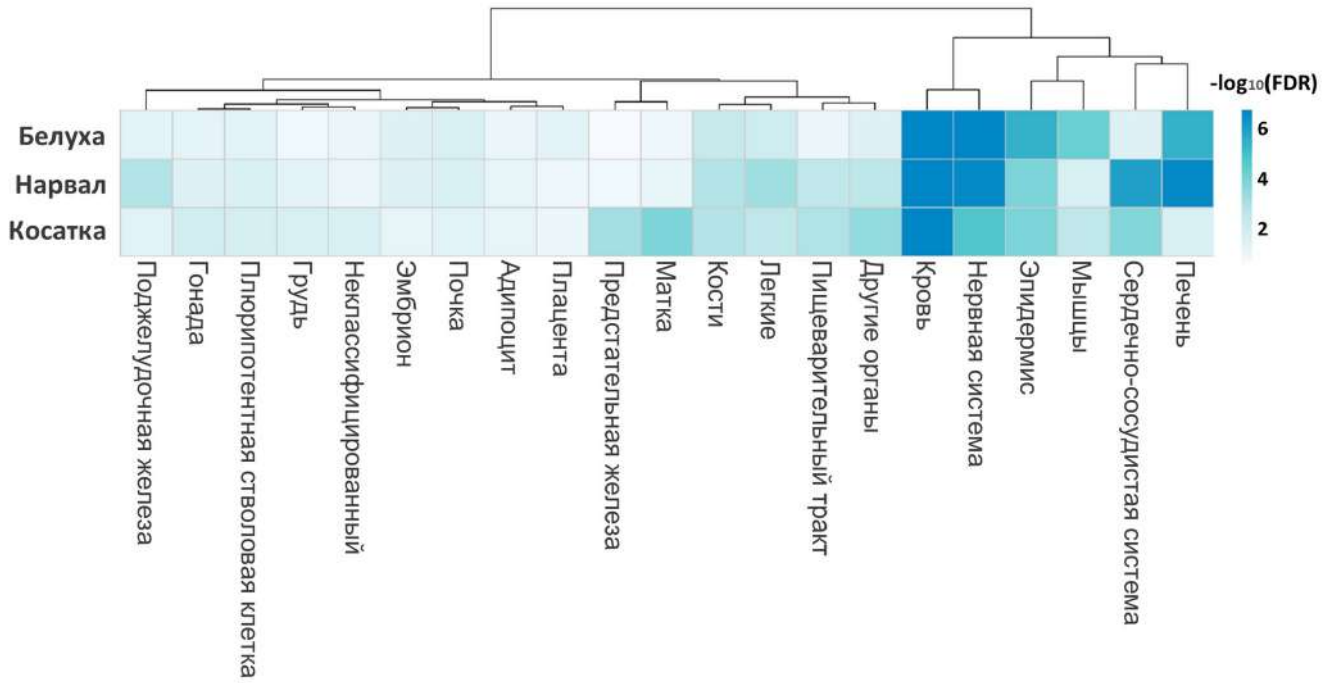


Рисунок 34 – Тепловая карта тканевого обогащения эволюционно ускоренных регионов у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием

Полученные результаты позволяют рассматривать регуляторный потенциал выявленных ЭУР на нескольких уровнях. Изменения соответствия нуклеотидных последовательностей мотивам связывания транскрипционных факторов указывают на возможность изменения взаимодействия регуляторных белков с ДНК, тогда как перекрытие ЭУР с участками открытого хроматина и участками, обогащенными определенными гистоновыми модификациями, позволяет предположить функциональную значимость соответствующих геномных последовательностей.

При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать тканевую специфичность регуляторных элементов. Использованные в настоящей работе данные ChIP-seq обыкновенного дельфина были получены при исследовании печени, что ограничивает возможности характеристики регуляторных элементов нервной, эндокринной и репродуктивной систем. Отсутствие перекрытия ЭУР с участками, обогащенными исследованными гистоновыми модификациями, не исключает их регуляторной активности в других тканях или на отдельных стадиях онтогенеза.

Использование эпигеномных данных человека позволило расширить спектр анализируемых тканей и типов клеток. Особый интерес в контексте исследуемого фенотипа представляет выявленное обогащение участками открытого хроматина в нервной ткани и клетках иммунной системы, поскольку продолжительный пострепродуктивный период предполагает длительное поддержание функций различных физиологических систем организма. Вместе с тем

эволюционная сохранность нуклеотидной последовательности не обязательно сопровождается сохранением ее регуляторной активности в соответствующих тканях у разных видов.

Таким образом, сопоставление выявленных ускоренных регионов с регуляторными и эпигеномными данными человека и китообразных показало, что часть этих регионов перекрывается с участками генома, обладающими признаками регуляторной активности. Полученные результаты позволяют рассматривать такие регионы в качестве потенциальных цис-регуляторных элементов, изменения которых могут иметь значение для регуляции экспрессии генов.

3.5.3. Гены, связанные с эволюционно ускоренными регионами у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием, и их функциональный анализ

Для выявления генов, в пределах которых или в регуляторных доменах, которых у всех трех исследуемых видов обнаруживались ЭУР, использовали два подхода к аннотации относительно белок-кодирующих генов человека. В первом случае определяли непосредственное перекрытие ЭУР с генами. Таким способом было выявлено 300 генов, в пределах которых у каждого из трех видов располагался хотя бы один ЭУР. Во втором случае анализировали расположение ЭУР относительно регуляторных доменов генов. В результате было выявлено 1208 генов, в регуляторных доменах которых у каждого вида обнаруживался хотя бы один ЭУР. Оба подхода позволяли учитывать случаи, когда у разных видов ускоренные регионы затрагивали различные участки одного и того же гена или его регуляторного домена. Полученные наборы генов использовали для последующего функционального анализа.

Анализ функционального обогащения 300 генов по терминам генной онтологии (Gene Ontology, GO) выявил 263 статистически значимо обогащенные категории биологических процессов (Biological Process). После снижения семантической избыточности основные функциональные направления сохранялись и включали развитие нервной системы (nervous system development, GO:0007399), развитие отростков нейронов (neuron projection development, GO:0031175), организацию синапсов (synapse organization, GO:0050808) и регуляцию транссинаптической передачи сигналов (regulation of trans-synaptic signaling, GO:0099177) (Таблица Ж.6).

Анализ тканевой специфичности экспрессии генов с ЭУР показал обогащение исследуемого набора генами, преимущественно экспрессирующимися в коре головного мозга (Рисунок Ж.3). Повышенные показатели обогащения также наблюдались для яичников и

предстательной железы. Для оценки возможной связи выявленных генов с репродуктивной функцией дополнительно проанализировали их экспрессию в репродуктивных тканях. Среди генов, экспрессирующихся как в коре головного мозга, так и в тканях репродуктивной системы, были выделены *SOX5, CTNNA2, EPHB1, ZFHX4, DCC* и *SYN3*.

Гены *SOX5* и *ZFHX4* кодируют транскрипционные факторы, участвующие в развитии нервной системы [303,304]. Вместе с тем для них выявлены ассоциации с репродуктивными признаками: варианты в области *SOX5* связаны с нарушениями сперматогенеза у мужчин [305], а варианты в локусе *ZFHX4* – с возрастом наступления менархе у женщин [306]. Гены *CTNNA2* и *SYN3* участвуют в развитии нейронных связей и регуляции синаптической передачи [307–310]. Экспериментальные данные, непосредственно связанные с репродуктивными процессами, получены для *EPHB1* и *DCC*. У мышей после индукции овуляции хорионическим гонадотропином наблюдалось повышение уровня фосфорилирования EPHB1 в гранулезных клетках [311]. Инактивация *Dcc* приводила к нарушению миграции гонадолиберинового нейронов в передний мозг, указывая на его роль в формировании нейроэндокринной системы, регулирующей репродуктивную функцию [307].

Таким образом, среди выявленных генов присутствуют кандидаты, связанные с половым созреванием, сперматогенезом, овуляторным ответом и формированием нейроэндокринной системы.

Полученные результаты представляют интерес в контексте эволюционных гипотез пострепродуктивного долголетия, предполагающих значение социальной роли старших самок. Одним из возможных объяснений этого феномена является гипотеза бабушки, предполагающая, что прекращение размножения может сопровождаться увеличением вклада самок в выживание и репродуктивный успех родственников. Ellis et al. [11] показали, что у зубатых китов с менопаузой увеличивается продолжительность совместной жизни самок с потомками и внуками без соответствующего увеличения периода одновременного размножения матерей и дочерей. Для косаток установлено, что пострепродуктивные самки повышают выживаемость своих внуков [116] и потомства, особенно взрослых сыновей [114]. При этом возможные преимущества пострепродуктивного долголетия не ограничиваются непосредственной помощью родственникам. Brent et al. [115] показали, что пострепродуктивные самки косаток чаще возглавляют перемещения группы, особенно в периоды недостатка пищевых ресурсов. Эти наблюдения согласуются с гипотезой о значении накопленного экологического опыта и его передачи следующим поколениям, предполагающей важную роль сохранения когнитивных функций в старшем возрасте. Таким образом, общие ЭУР обнаружены в генах, связанных с репродуктивными процессами, а также развитием и функционированием нервной системы.

Учитывая близкое филогенетическое родство нарвала и белухи, устойчивость функциональных результатов проверяли при поочередном исключении каждого из этих видов. Для пар косатка-нарвал и косатка-белуха повторно проводили анализ генов, связанных с ЭУР. В обоих сравнениях сохранялись все 20 репрезентативных категорий GO, выявленных при анализе трех видов, а кора головного мозга оставалась единственной тканью со статистически значимым обогащением. Полученные результаты показывают, что основные закономерности сохранялись при исключении каждого из двух близкородственных монодонтид и не были обусловлены исключительно их совместным включением в анализ.

Дополнительно были проанализированы гены, в пределах регуляторных доменов которых выявлено наибольшее число ЭУР. Наибольшее число ЭУР у косатки было выявлено в регуляторном домене гена *TTLL7* – 199 ЭУР, у нарвала – *PCDHGA6* (59 ЭУР), у белухи – *ZNF615* (42 ЭУР). Во всех трех случаях обогащение ЭУР было статистически значимым (FDR < 0,05) (Рисунок 35). Ген *TTLL7* кодирует фермент, осуществляющий полиглутамилирование β-тубулина. Экспериментально показано его участие в росте нейритов [312]. Ген *PCDHGA6* входит в кластер γ-протокадгеринов, белковые продукты которого участвуют в межклеточном распознавании нейронов и формировании нейронных связей [313]. Ген *ZNF615* кодирует белок с доменами цинковых пальцев, для которого предполагается участие в регуляции транскрипции [314].

При пороговом значении не менее пяти ЭУР в регуляторном домене гена у каждого из трех исследуемых видов было выявлено 25 генов, соответствующих данному критерию одновременно у косатки, нарвала и белухи (Таблица Ж.7). Среди них *MEF2C, TCF4, BCL11A, MEIS2, ZNF521, LMO4, CADM1, LSAMP, TENM3, CDH13, NTRK3, QKI* и *MSI2*, связанные преимущественно с развитием нервной системы, нейрональной адгезией, организацией синапсов, посттранскрипционной регуляцией и миелинизацией. Вместе с тем для ряда выявленных генов имеются экспериментальные данные об участии в репродуктивных процессах. Так, подавление экспрессии *Zfhx3* у мышей приводило к нарушениям формирования веретена деления и расхождения хромосом при мейотическом созревании ооцитов [233]. В экспериментах на овариальной ткани крыс нейротрофин NT3, действующий через рецептор *NTRK3*, способствовал переходу примордиальных фолликулов в первичные [315]. Гены *SOX9* и *MEIS2* также участвуют в развитии и дифференцировке гонад [316,317]. Связь с возрастными изменениями нервной системы установлена для *MEF2C*: у мышей с возрастом снижалась его экспрессия в микроглии, а экспериментальная инактивация сопровождалась усилением воспалительного ответа [318]. Таким образом, функциональная характеристика генов с множественными ЭУР включает не только процессы развития нервной системы, но и репродуктивные процессы, а также механизмы, связанные с возрастными изменениями нервной системы.

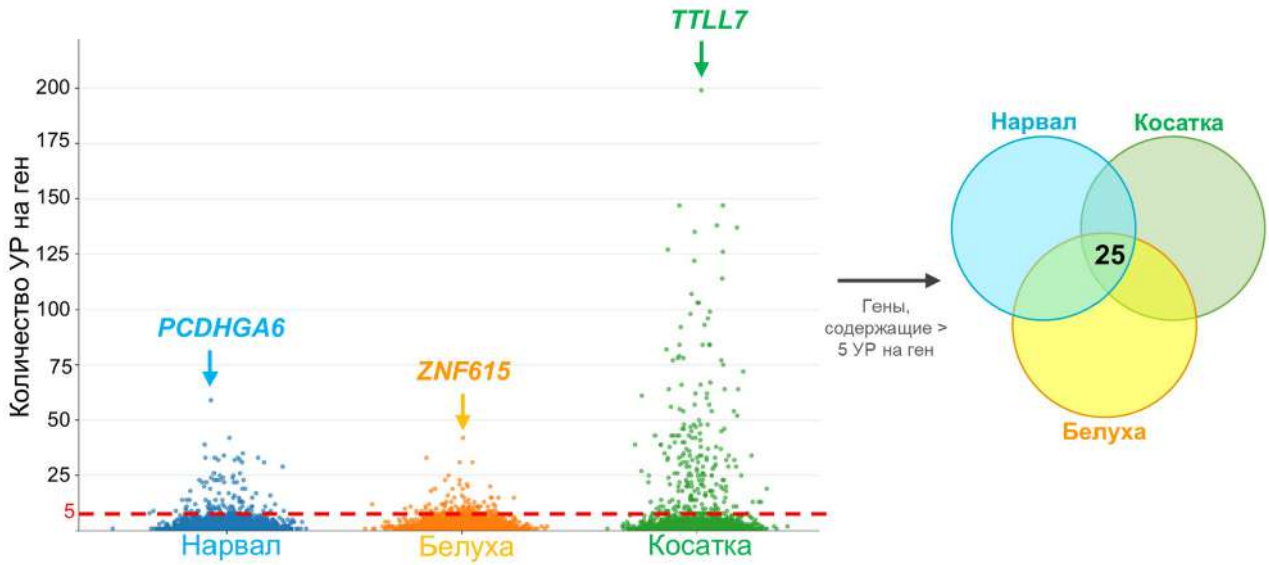


Рисунок 35 – Гены с множественными ускоренными регионами у зубатых китов с продолжительным пострепродуктивным периодом жизни

Для оценки согласованности полученных результатов с ранее опубликованными данными было проведено сопоставление ЭУР косатки с 2608 ускоренными регионами, выявленными Ferris et al. [41] при сравнительном анализе геномов млекопитающих. Обнаружено 22 совпадающих региона, составляющих 0,84 % набора Ferris et al. и 0,29 % ЭУР косатки, выявленных в настоящем исследовании. Ни один из совпадающих участков не входил в число 29 ЭУР, общих для косатки, нарвала и белухи. Среди генов, ассоциированных с совпадающими ЭУР, был выявлен *RXFP2*, ранее описанный среди генов-кандидатов, связанных с генетической дифференциацией экотипов косаток и потенциально участвующих в репродуктивной изоляции [119]. Кроме того, обнаружены гены *CDH23* и *TMC1*, для которых ранее были выявлены признаки адаптивной эволюции при исследовании молекулярных механизмов слуха и эхолокации у зубатых китов [319]. Таким образом, обнаружение 22 совпадающих ЭУР свидетельствует о том, что ускоренная эволюция отдельных геномных регионов косатки выявляется как при сравнении с широким кругом млекопитающих, так и с близкородственными видами зубатых китов. Наличие среди ассоциированных генов кандидатов, ранее исследованных в контексте других эволюционных особенностей косатки и зубатых китов, позволяет предположить, что эти регионы могут быть связаны с различными аспектами их эволюции, не обязательно обусловленными пострепродуктивным долголетием.

Таким образом, сравнительно-геномный анализ позволил выявить консервативные участки генома, характеризующиеся ускоренной эволюцией у косатки, нарвала и белухи – трех видов зубатых китов с продолжительным пострепродуктивным периодом. При этом ЭУР обнаруживались как в совпадающих по координатам геномных участках, так и в различных

участках одних и тех же генов и их регуляторных доменов. Функциональный анализ генов, непосредственно перекрываемых ЭУР, выявил обогащение категориями GO, связанными преимущественно с развитием нервной системы и организацией синапсов. Преобладание нейробиологических категорий представляет интерес с учетом того, что у исследованных видов продолжительный пострепродуктивный период связан преимущественно с увеличением общей продолжительности жизни самок, а не удлинением репродуктивного периода. В этом контексте выявленные функциональные закономерности могут отражать молекулярно-генетические особенности, потенциально связанные с поддержанием функций нервной системы в течение продолжительной жизни.

3.6. Интегративный анализ результатов геномных исследований

Для выявления общих генов, потенциально связанных с продолжительным репродуктивным периодом у плацентарных млекопитающих, репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью у фермерских самок соболя, отложенной имплантацией у куньих, а также продолжительным пострепродуктивным периодом у зубатых китов, было проведено сопоставление наборов генов, сформированных по результатам четырех проведенных исследований. При формировании итоговых наборов трех межвидовых сравнительно-геномных исследований учитывали гены, непосредственно перекрывающиеся с ЭУР, и гены, в регуляторных доменах которых были выявлены ЭУР. В результате были сформированы наборы, включавшие 1244 уникальных гена для зубатых китов, 1209 – для плацентарных млекопитающих и 753 – для куньих. В четвертый набор вошли 419 генов, расположенных в кандидатных геномных регионах с признаками действия отбора, выявленных при сравнении самок соболя с репродуктивным долголетием с контрольными фермерскими самками (Приложение И, Таблица И.1).

Кроме того, было проведено сопоставление результатов геномных исследований с тремя внешними наборами генов (Таблица 3): генами, связанными с возрастом наступления естественной менопаузы (ReproGen [15]), генами, ассоциированными с женским бесплодием и нарушениями полового развития (FeRGI, [218]) и генами, связанными с процессами старения (GenAge ресурса Human Ageing Genomic Resources (HAGR) [219]).

Таблица 3 – Краткое описание баз данных ReproGen, FeRGI и GenAge

Источник внешнего набора генов	Описание
ReproGen (Reproductive Genetics Consortium)	Включает данные метаанализа результатов полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) с участием 201 323 женщин европейского происхождения, в результате которого были выявлены 290 независимых генетических сигналов, связанных с возрастом наступления менопаузы. На основании функциональной аннотации вариантов, данных об их связи с экспрессией генов и их расположения в геноме были приоритизированы 283 уникальных гена-кандидата, которые и были использованы в настоящем анализе.
FeRGI (Female Reproductive Genetics Initiative)	База содержит сведения о генах, связанных с моногенными формами женского бесплодия и нарушениями полового развития, с указанием уровня доказательности этих связей. В частности, в систематическом обзоре Van Der Kelen et al. (2023) [218] были проанализированы более 45 тыс. научных публикаций, из которых 1078 соответствовали критериям включения. Авторы идентифицировали 395 генов и оценили 466 связей между генами и заболеваниями с использованием стандартизированной системы оценки доказательности. Для настоящего анализа из базы FeRGI отобрали 105 генов, для которых хотя бы одна связь с заболеванием имела уровень доказательности не ниже умеренного (*moderate*, *strong* или *definitive*).
GenAge (Ageing Gene Database)	База объединяет кандидатные гены, связанные со старением человека и отобранные на основе литературных данных, и гены модельных организмов, для которых описано влияние генетических изменений на процессы старения или продолжительность жизни. В анализ были включены 307 генов человека и человеческие ортологи генов модельных организмов. После объединения списков и исключения повторов итоговый набор содержал 1524 уникальных гена.

При попарном сопоставлении наборов генов, полученных в трех межвидовых сравнительно-геномных исследованиях зубатых китов, плацентарных млекопитающих и куньих, число общих генов во всех случаях значимо превышало случайное ожидание (FDR < 0,05). В каждом из этих попарных сравнений обнаружено более 250 общих генов (обогащение более чем в 5 раз). Пересечения с четвертым набором генов, полученным по результатам внутривидового сравнительного анализа самок соболя, характеризовались меньшим числом общих генов (обогащение от 1,5 до 2 раз, Рисунок 36, Таблица И.7).



Рисунок 36 – Попарные пересечения наборов генов, сформированных по результатам четырех геномных исследований и трех баз данных. На диагонали указано число генов в каждом наборе, выше диагонали – число общих генов и обогащение относительно случайного ожидания (×). Звездочкой отмечены статистически значимые пересечения (FDR < 0,05)

Дополнительно были определены гены, представленные одновременно во всех трех межвидовых сравнительно-геномных наборах. В результате был выявлен 161 общих генов для зубатых китов, плацентарных млекопитающих и куньих (Рисунок 37). Число общих генов статистически значимо превышало случайное ожидание (161 против 3,14 в среднем, $p_{perm} \approx 10^{-6}$).

Для их функциональной характеристики был проведен анализ обогащения терминами генной онтологии (Gene Ontology, GO), в результате которого выявлено 182 статистически значимых термина (FDR < 0,05) (Рисунок И.1, Таблица И.6). Среди них были представлены категории развития эмбриона (GO:0009790), развития гонад (GO:0008406), развития репродуктивной системы (GO:0061458) и процессов развития, связанных с размножением (GO:0003006). В категории развития гонад и репродуктивной системы входили семь генов: *BMPR1B, FER, GFRA1, GJA1, NR2F2, SOX9* и *WNT5A*. Присутствие этих генов в общем наборе указывает на то, что часть выявленных геномных локусов связана с генами, участвующими в развитии репродуктивной системы.

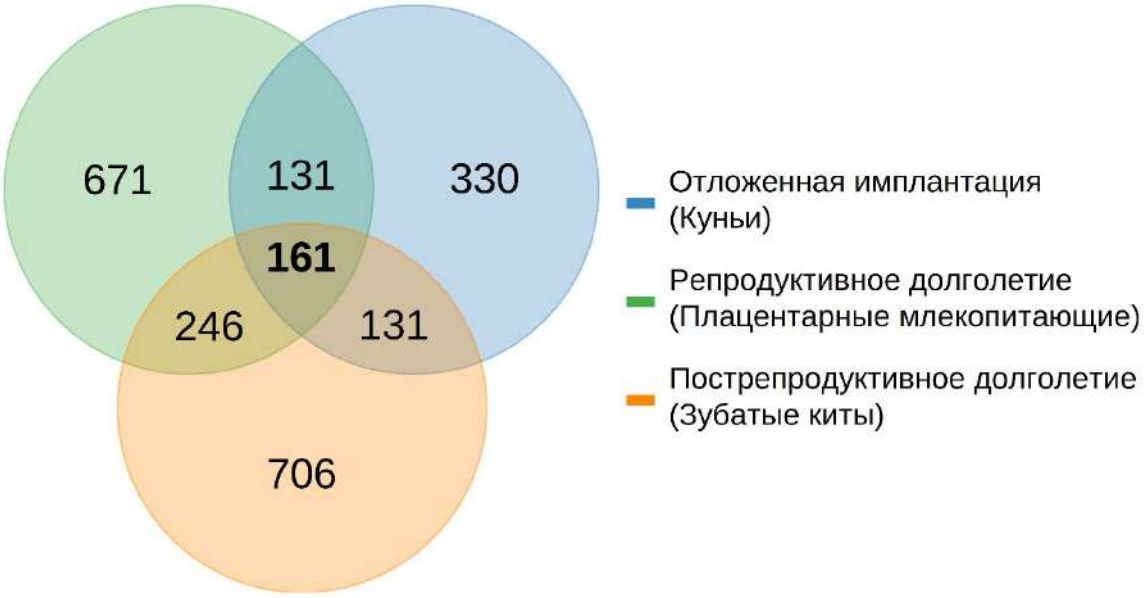


Рисунок 37 – Диаграмма Венна, отражающая пересечения наборов генов, полученных по результатам трех межвидовых сравнительно-геномных исследований куньих, зубатых китов и других плацентарных млекопитающих

Значительная часть обогащенных биологических процессов была также связана с развитием нервной системы, включая развитие аксонов (GO:0061564), регуляцию аксоногенеза (GO:0050770), регуляцию дифференцировки нейронов (GO:0045664) и организацию межклеточных контактов (GO:0034330). Интересно, что связь ЭУР с генами, участвующими в развитии нервной системы, ранее отмечалась и в других сравнительно-геномных исследованиях. В частности, Holloway et al. (2016) [40] выявили ускоренные некодирующие последовательности в эволюционной линии, ведущей к сумчатым и плацентарным млекопитающим, и экспериментально показали регуляторную активность отдельных элементов в областях головного мозга, участвующих в гормональной регуляции физиологических процессов, включая сокращения матки и рефлекс молокоотдачи.

Нейробиологические категории представляют особый интерес также в контексте возможной взаимосвязи нейроэндокринной регуляции и старения. В экспериментальном исследовании Zhang et al. (2013) [320] было показано, что изменение активности сигнального пути IKKβ–NF-κB в гипоталамусе мышей влияет на процессы старения, а введение гонадотропин-рилизинг-гормона ослабляет возрастное снижение нейрогенеза и замедляет развитие признаков старения. Таким образом, результаты функционального обогащения указывают на возможную связь генов, затронутых ЭУР, с биологическими процессами, участвующими в регуляции репродуктивной функции и старения.

На следующем этапе к анализу был добавлен четвертый набор генов, полученный при исследовании соболей с репродуктивным долголетием. При его сопоставлении со 161 геном,

общим для трех межвидовых сравнительно-геномных исследований, было выявлено пять генов, представленных во всех четырех наборах: *APAF1, ATP11B, EPHA3, MMS22L и TMCO5A* (Рисунок 38). Число генов, общих для всех четырех наборов, статистически значимо превышало случайное ожидание (5 против 0,069 в среднем, $p_{perm} \approx 10^{-6}$).

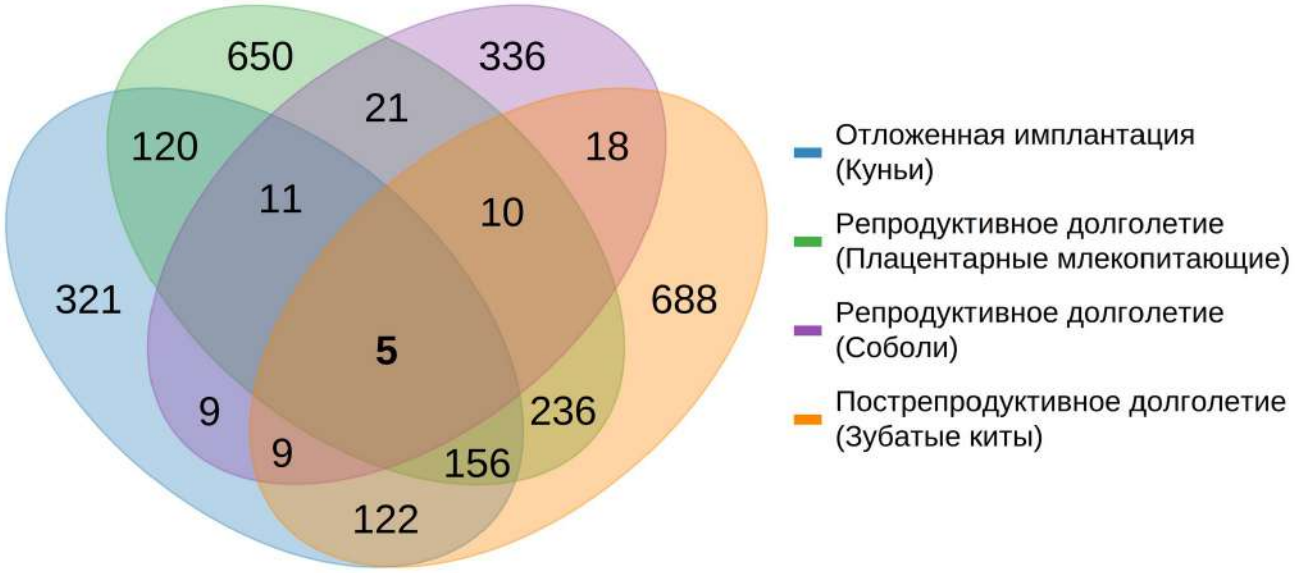


Рисунок 38 – Диаграмма Венна, отражающая пересечения наборов генов, полученных по результатам четырех геномных исследований куньих, соболей, зубатых китов и других плацентарных млекопитающих

Два из этих генов, *APAF1* и *EPHA3*, входили в статистически значимые категории GO, выявленные при функциональном анализе 161 общего гена. В частности, *APAF1* был представлен в категориях ответа на фактор роста (GO:0070848) и клеточного ответа на трансформирующий фактор роста β (GO:0071560), а *EPHA3* – в категориях морфогенеза клеток (GO:0000902), направленного роста аксонов (GO:0007411) и сигнального пути рецепторных тирозинкиназ (GO:0007169). Для уточнения возможного биологического значения пяти общих генов были рассмотрены опубликованные экспериментальные исследования их функций.

Ген *APAF1*, участвующий в митохондриальном пути апоптоза, экспрессируется в клетках гранулезы яичников [321,322] и необходим для нормального развития нервной системы, что продемонстрировано в экспериментах на мышах [323]. Ген *ATP11B* кодирует АТФ-зависимую фосфолипидную транслоказу. Экспериментально показано, что инактивация *Atp11b* у мышей сопровождалась нарушением обмена железа, митохондриальной дисфункцией, усилением ферроптоза нейронов и ухудшением когнитивных функций. Напротив, повышение экспрессии *Atp11b* у старых мышей способствовало улучшению памяти и восстановлению структурных характеристик нейронов. В основе выявленных изменений лежали, в частности, нарушения сигнального пути Hippo-YAP [324]. Ген *EPHA3*, расположение ЭУР в области которого у исследованных видов представлено на рисунке 39, кодирует рецепторную тирозинкиназу

семейства Eph, участвующую в регуляции межклеточных взаимодействий, адгезии и миграции клеток. Его возможное значение для репродуктивной системы рассматривается в связи с функциями клеток гранулезы и эндометрия. Buensuceso и Deroo [235] показали, что фолликулостимулирующий гормон повышает экспрессию *Epha3* в клетках гранулезы мышей. Авторы также установили участие сигнальной системы Eph-эфрин в регуляции морфологии и адгезии этих клеток, однако непосредственный вклад *EPHA3* в наблюдавшиеся эффекты не был определен. В другом исследовании *EPHA3* был обнаружен в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия человека. Экспериментальное подавление его экспрессии снижало способность этих клеток поддерживать образование новых кровеносных сосудов в модельной системе [325]. Таким образом, имеющиеся данные указывают на участие EPHA3 в регуляции клеточных взаимодействий в тканях женской репродуктивной системы. Ген *MMS22L* кодирует компонент белкового комплекса MMS22L-TONSL, участвующего в поддержании геномной стабильности при репликативном стрессе. Показано, что этот комплекс способствует восстановлению нормального процесса репликации ДНК и репарации повреждений посредством RAD51-зависимой гомологичной рекомбинации. Подавление экспрессии *MMS22L* в клеточных моделях сопровождалось накоплением повреждений ДНК и нарушением процессов репарации [326,327]. Ген *TMCO5A* представляет интерес в связи с процессами сперматогенеза. Было показано, что *Tmco5a* преимущественно экспрессируется в семенниках крыс, а кодируемый им белок располагается вблизи микротрубочек манжетки – временной цитоскелетной структуры, участвующей в изменении формы головки сперматозоида на поздних стадиях его формирования [328].

Таким образом, пять генов, общих для всех четырех исследовательских наборов, связаны с различными клеточными процессами, включая поддержание геномной стабильности, регуляцию апоптоза, межклеточные взаимодействия и морфогенез. Экспериментальные данные также указывают на связь отдельных генов с процессами, происходящими в репродуктивных тканях, спермиогенезом и возрастными изменениями нервной системы. Полученные результаты позволяют выделить эти гены для дальнейшего изучения их возможной роли в регуляции репродуктивной функции и старения.

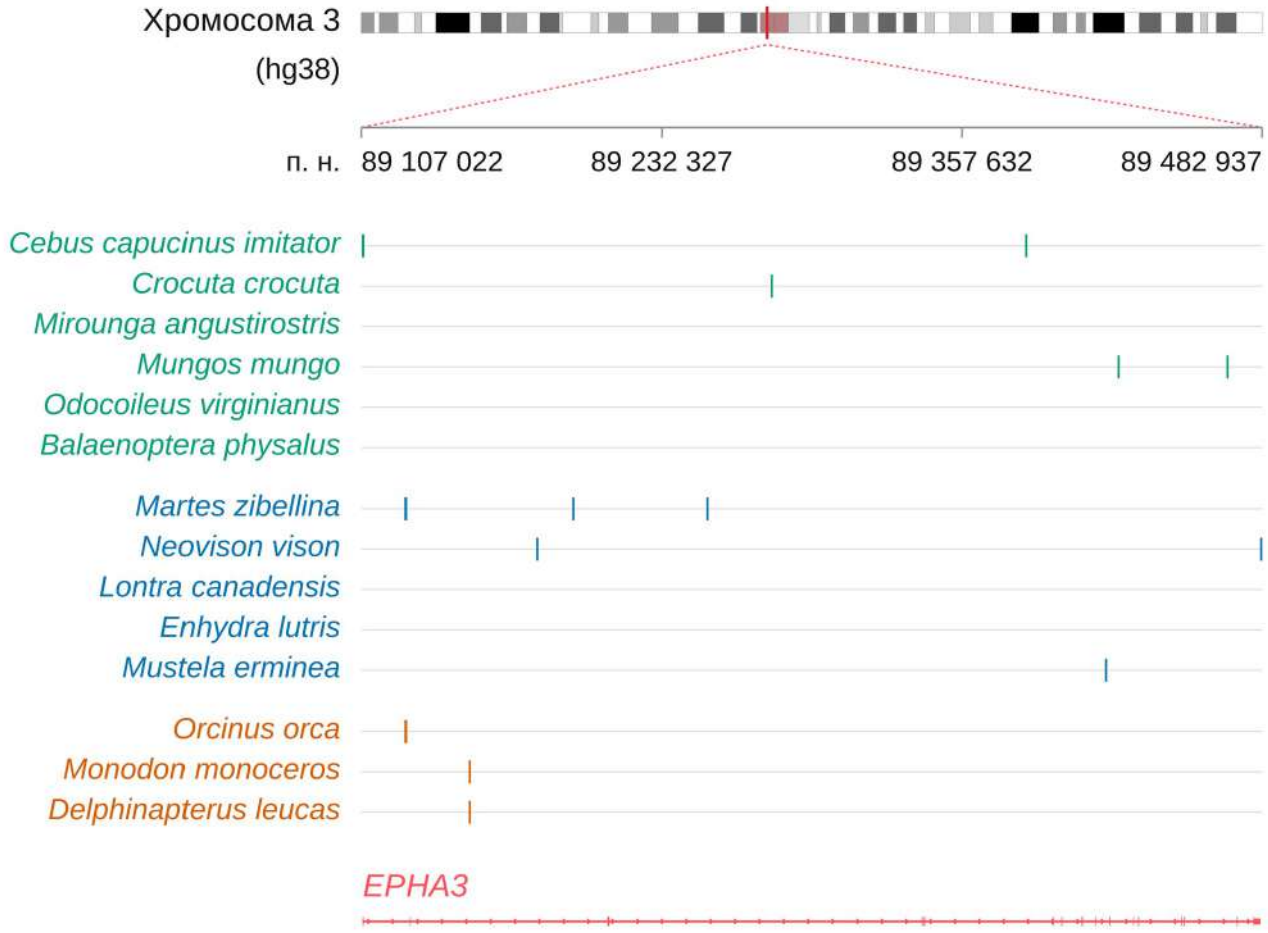


Рисунок 39 – Расположение эволюционно ускоренных регионов в области гена *EPHA3* у исследованных видов плацентарных млекопитающих, куньих и зубатых китов. Показаны геномные координаты (hg38), структура гена *EPHA3* и положения ЭУР отдельных видов, обозначенные вертикальными линиями

Таким образом, интегративный анализ показал, что у млекопитающих с различными особенностями репродуктивной биологии эволюционно ускоренные регионы затрагивают ряд общих генов. Функциональный анализ этих генов выявил обогащение категориями GO, связанными с развитием репродуктивной и нервной систем, межклеточными взаимодействиями и регуляцией клеточных процессов, потенциально значимых для репродуктивного старения и долголетия. Эти результаты позволяют предположить, что отложенная имплантация, длительное сохранение репродуктивной функции и продолжительный пострепродуктивный период могут быть связаны с эволюционными изменениями в сходных молекулярных путях.

Мы обнаружили, что ни один из датасетов, полученных по результатам сравнительно-геномного анализа, не имел значимых обогащений с базой данных FeRGI. Лишь 8 генов совпадали с набором генов, полученным на основе сравнительно-геномного анализа зубатых китов, 4 гена с набором генов плацентарных млекопитающих, 6 генов с набором генов куньих и 2 гена с набором генов соболей (Таблицы И.2-И.5). Относительно небольшое число пересечений может быть обусловлено не только ограниченным количеством генов в данной базе, но и

функциональной значимостью входящих в нее генов. Среди них преимущественно гены, нарушения функции которых приводят к тяжелым дефектам репродуктивного развития и бесплодию. Для генов, играющих ключевую роль в развитии и функционировании организма, характерно действие отрицательного отбора, препятствующего закреплению повреждающих мутаций, снижающих жизнеспособность или репродуктивный успех [329]. Таким образом, сильные эволюционные ограничения, действующие на такие гены, могут быть одной из причин их относительно редкого присутствия среди генов, связанных с выявленными ЭУР.

Дополнительно набор генов, связанных с женским бесплодием и отобранных из базы данных FeRGI, сопоставили с результатами генетического анализа пациенток с нарушениями функции ооцитов. В этот набор вошел ген *TUBB8*, в котором у одной из пациенток был выявлен миссенс-вариант p.(Ser176Leu), предположительно связанный с остановкой созревания ооцитов. В то же время ген *ZP4*, в котором у другой пациентки был обнаружен вариант p.(Leu342Pro), отсутствовал среди 105 генов, отобранных по уровню клинической доказательности. Такое различие может отражать неодинаковую степень изученности этих генов. В отличие от *TUBB8*, данные о связи *ZP4* с женским бесплодием пока ограничены сравнительно небольшим числом исследований, а функциональные последствия описанных вариантов остаются недостаточно изученными [288].

При сопоставлении с итоговыми наборами генов, полученными в исследованиях животных, совпадений для *TUBB8* и *ZP4* не выявлено. При этом ген *TUBB8* является специфичным для приматов, что ограничивает возможность его прямого сопоставления с геномами исследованных представителей других отрядов млекопитающих.

С набором генов ReproGen совпадал 31 ген зубатых китов, 25 – плацентарных млекопитающих, 22 – куньих и 6 – соболей. При этом восемь генов (*BMPR1B, EBF3, ELAVL2, ETAA1, GJA1, IKZF2, WWOX и ZNF704*) были представлены одновременно во всех трех наборах генов, полученных в межвидовых сравнительно-геномных исследованиях, и в наборе ReproGen.

При сравнении с базой GenAge были выявлены 101 общих генов у зубатых китов, 92 – у плацентарных млекопитающих, 62 – у куньих и 41 – у соболей, которые представляют интерес для дальнейшего изучения связей между процессами соматического старения и особенностями репродуктивной функции. При этом 12 генов из базы данных GenAge были представлены во всех трех наборах генов, полученных в межвидовых сравнительно-геномных исследованиях: *CELF4, DIAPH3, ELAVL2, NRG1, PAPPA, PEX14, PIK3C3, PIK3R1, PRMT6, RFX7, RORA и TXNL1*. Среди них особый интерес представляют гены *PAPPA, NRG1, ELAVL2* и *PIK3C3,* для которых экспериментально показано участие в регуляции репродуктивных процессов. Ген *PAPPA* кодирует металлопротеиназу, регулирующую локальную биодоступность инсулиноподобных факторов роста (IGF) посредством расщепления связывающих их белков. В яичниках человека

PAPP-A обнаружен в фолликулярной жидкости и клетках гранулезы, а его активность связана с регуляцией фолликулярного развития [330]. При этом было показано, что экспериментальная инактивация *Pappa* у мышей сопровождалась увеличением средней и максимальной продолжительности жизни на 30-40 % [331]. Ген *NRG1* также участвует в регуляции функций гранулезных клеток и созревания ооцитов. У мышей его направленная инактивация в клетках гранулезы нарушала временную регуляцию мейотического созревания, что отрицательно влияло на оплодотворение [332]. Ген *ELAVL2*, также представленный в наборе генов ReproGen, кодирует РНК-связывающий белок, участвующий в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов в ооцитах. Экспериментально показано, что инактивация *Elavl2* у самок мышей нарушает формирование примордиальных фолликулов и приводит к бесплодию [333]. Ген *PIK3C3* кодирует киназу VPS34, участвующую в регуляции аутофагии и митофагии. Его специфическая инактивация в ооцитах мышей сопровождалась нарушением раннего эмбрионального развития, тогда как фармакологическая активация VPS34 способствовала улучшению качества ооцитов у возрастных животных [334]. Отдельного внимания заслуживает ген *RORA*, участвующий в регуляции циркадных ритмов и функционировании нервной системы. У мышей с мутацией *Rora* наблюдались снижение количества ооцитов и уменьшение числа детенышей в помете, что указывает на его возможную роль в регуляции репродуктивной функции [335]. Ген *DIAPH3* кодирует белок mDia2, участвующий в организации цитоскелета. Экспериментальное подавление его экспрессии в ооцитах мышей приводило к нарушениям формирования мейотического веретена и снижению частоты созревания ооцитов [336]. Интерес представляет также транскрипционный фактор RFX7, для которого показано участие в регуляции экспрессии длинной некодирующей РНК *NORSF*, влияющей на экспрессию *CYP19A1* и выработку эстрадиола клетками гранулезы. У свиней вариант в промоторе *NORSF*, изменяющий связывание RFX7, был связан с количеством родившихся поросят [337].

Несмотря на использование единого методологического подхода в трех межвидовых сравнительно-геномных исследованиях, исходные наборы консервативных геномных элементов формировали отдельно для каждого исследования. Это было обусловлено различиями в филогенетическом составе фоновых групп. Геномные последовательности, характеризующиеся высокой консервативностью в пределах отдельного семейства или отряда, не обязательно сохраняют аналогичную степень консервативности при сравнении филогенетически удаленных групп млекопитающих. Использование единого набора консервативных элементов могло бы привести к исключению участков, для которых эволюционная консервативность характерна только в пределах отдельных таксономических групп.

Таким образом, исходные наборы геномных регионов, анализируемых на наличие признаков ускоренной эволюции, различались между исследованиями. Это необходимо

учитывать при непосредственном сопоставлении ЭУР, поскольку отсутствие определенного региона в результатах одного из исследований может быть обусловлено как отсутствием признаков ускоренной эволюции, так и отсутствием данного региона в исходном наборе консервативных элементов. В этом отношении сопоставление результатов на уровне генов и биологических процессов позволяет дополнительно охарактеризовать сходство и различия геномных особенностей исследованных репродуктивных фенотипов.

При сопоставлении результатов отдельных направлений настоящего исследования необходимо учитывать различия в биологической природе исследованных признаков. Длительное сохранение репродуктивной функции характеризует возрастную динамику способности к размножению, тогда как продолжительный пострепродуктивный период отражает особенности соотношения продолжительности репродуктивного периода и общей продолжительности жизни. Отложенная имплантация, в свою очередь, представляет собой механизм регуляции сроков эмбрионального развития и непосредственно не является показателем репродуктивного старения. В связи с этим различия между наборами выявленных генов могут отражать особенности молекулярных механизмов, лежащих в основе каждого из исследованных признаков.

Вместе с тем наличие общих генов в результатах нескольких сравнительно-геномных исследований не предполагает обязательного совпадения конкретных генетических изменений и их функциональных последствий. Выявление признаков ускоренной эволюции также не позволяет однозначно определить характер эволюционных процессов, обусловивших увеличение скорости нуклеотидных замен. Такие изменения могут быть связаны как с действием положительного отбора, так и с ослаблением эволюционных ограничений.

Кроме того, один и тот же ген может участвовать в различных физиологических процессах, а изменения его регуляции могут иметь неодинаковые последствия в зависимости от типа ткани, стадии развития и биологических особенностей вида. В связи с этим особый интерес представляет изучение функциональной роли выявленных генов в контексте различных репродуктивных фенотипов.

Таким образом, сопоставление результатов геномных исследований позволило выделить ряд генов-кандидатов, представляющих интерес для изучения взаимосвязи репродуктивной функции и процессов соматического старения. Полученные данные расширяют представления о геномных особенностях различных репродуктивных фенотипов у плацентарных млекопитающих и создают основу для дальнейшего исследования молекулярно-генетических механизмов репродуктивного и пострепродуктивного долголетия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе проведено комплексное исследование молекулярно-генетических факторов, связанных с сохранением, регуляцией и нарушением репродуктивной функции, а также с пострепродуктивным долголетием у плацентарных млекопитающих. Для решения этой задачи были объединены сравнительно-геномный анализ видов с различными репродуктивными фенотипами, исследование внутривидовой изменчивости у самок соболя с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью, а также молекулярно-генетическое исследование пациенток с нарушениями репродуктивной функции. Такой подход позволил сопоставить результаты исследований различных репродуктивных фенотипов, выделить общие гены-кандидаты и охарактеризовать молекулярные процессы, связанные с регуляцией репродуктивной функции и старением.

Сравнительно-геномный анализ филогенетически удаленных видов с поздним началом репродуктивного старения или его слабо выраженными признаками позволил выявить 150 геномных регионов с признаками ускоренной эволюции, общих не менее чем для трех из шести исследованных видов. Кроме того, было определено 149 генов, в пределах которых ЭУР присутствовали у всех шести видов независимо от совпадения координат самих регионов. Особый интерес представляет ген *ZBTB20*, связанный с нейроэндокринной регуляцией репродуктивной функции, в пределах которого ЭУР были выявлены у всех шести видов, а отдельные участки совпадали по координатам не менее чем у трёх видов. Среди других кандидатов выделены *FANCL*, *IPO8* и *ZFHX3*, в регуляторных доменах которых у всех шести видов были обнаружены множественные ЭУР. Эти гены участвуют в процессах репарации ДНК, мейотического созревания ооцитов и раннего эмбрионального развития. Таким образом, результаты анализа показывают, что ускоренная эволюция у исследованных видов затрагивала как совпадающие по координатам геномные участки, так и различные участки одних и тех же генов, среди которых представлены кандидаты, связанные с регуляцией репродуктивной функции.

Генетические особенности репродуктивного долголетия исследовали также на внутривидовом уровне на примере соболя. При сопоставлении результатов поиска регионов отбора у самок с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью относительно контрольных фермерских и диких самок было выделено 73 кандидатных гена. Среди них представлены *SYCP2L*, участвующий в поддержании овариального резерва, *PALB2*, связанный с репарацией ДНК, и *PLK1*, необходимый для мейотического созревания ооцитов. Особый интерес представляют миссенс-варианты в генах *ASPM* p.(Arg1940Ser) и p.(Gln2900Arg), *COQ7* p.

(Ser36Thr) и *VGLL4* p.(Arg85His), частоты альтернативных аллелей которых были выше у исследуемых самок по сравнению с контрольными группами фермерских и диких самок. Варианты *COQ7* p.(Ser36Thr) и *VGLL4* p.(Arg85His) также располагались в кандидатных регионах отбора. Совокупность результатов полногеномного анализа и функциональной аннотации позволяет предположить, что отдельные выявленные гены и генетические варианты могут быть связаны с длительным сохранением репродуктивной способности у самок соболя.

Одной из особенностей репродуктивной биологии соболя и ряда других представителей семейства куньих является отложенная имплантация эмбриона. Исследование пяти видов куньих с отложенной имплантацией позволило выявить 59 геномных регионов с признаками ускоренной эволюции, общих не менее чем для трех видов. Функциональный анализ генов, выявленных при аннотации ЭУР, показал обогащение категориями, связанными с эмбриональным развитием, клеточной адгезией и регуляцией плюрипотентности. Среди выявленных категорий также представлены процессы эпителиально-мезенхимного перехода и сигнальные пути WNT и Hippo. Сопоставление результатов сравнительно-геномного анализа с опубликованными транскриптомными данными американской норки позволило выделить гены-кандидаты *FZD3*, *VIPR2*, *ORC4*, *TPST1* и *NR5A2*, потенциально значимые для регуляции репродуктивного цикла и имплантации. Особый интерес представляет *FZD3*, в регуляторном домене которого ЭУР были выявлены у всех пяти исследованных видов, а изменение экспрессии наблюдалось при переходе от эмбриональной диапаузы к реактивации бластоцисты.

Взаимосвязь репродуктивного и соматического старения представляет особый интерес у видов с продолжительным пострепродуктивным периодом. У косатки, нарвала и белухи было выявлено 29 общих геномных регионов с признаками ускоренной эволюции, число которых значительно превышало ожидаемое при случайном совпадении. Среди непосредственно перекрывающихся с ними генов представлены *DNM1L*, участвующий в регуляции динамики митохондрий, *BIRC6*, связанный с апоптозом, и *STX8*, участвующий во внутриклеточном транспорте. Для генов *DNM1L* и *BIRC6* в литературе описана связь с нарушениями репродуктивной функции. Часть общих ЭУР перекрывалась с кандидатными цис-регуляторными элементами генома человека, а анализ последовательностей выявил изменения предсказанных сайтов связывания транскрипционных факторов. Функциональный анализ генов, выявленных при аннотации ЭУР, показал преобладание процессов развития нервной системы, организации синапсов и межклеточных взаимодействий.

Представленность нейробиологических процессов представляет особый интерес в контексте эволюционных гипотез пострепродуктивного долголетия, предполагающих важную роль старших самок в выживании и репродуктивном успехе родственников. В частности, для косаток установлено, что пострепродуктивные самки способствуют выживанию потомков и

передаче накопленного экологического опыта следующим поколениям. Преобладание функциональных категорий, связанных с развитием нервной системы и синаптической передачей, позволяет рассматривать выявленные гены в качестве кандидатов для дальнейшего изучения механизмов поддержания функций нервной системы при пострепродуктивном долголетии.

Для изучения молекулярно-генетических причин нарушений репродуктивной функции у человека проведено исследование женщин с патологией ооцитов. У пациентки с остановкой созревания ооцитов на стадии метафазы I был выявлен редкий миссенс-вариант в гене *TUBB8* c.527C>T, p.(Ser176Leu), предположительно нарушающий формирование мейотического веретена. У пациентки с аномальной морфологией блестящей оболочки был выявлен редкий миссенс-вариант в гене *ZP4* c.1025T>C, p.(Leu342Pro), предположительно нарушающий структурную организацию блестящей оболочки ооцитов. Полученные результаты показывают, что нарушения репродуктивной функции могут затрагивать различные молекулярные механизмы, обеспечивающие созревание ооцита, формирование его внеклеточных структур и последующее эмбриональное развитие.

Результаты проведенных исследований отражают разнообразие геномных особенностей млекопитающих с различными репродуктивными фенотипами. Вместе с тем при сопоставлении результатов трех межвидовых сравнительно-геномных исследований был выявлен 161 общий ген. Среди них представлены *BMPR1B, NR2F2, SOX9* и *WNT5A*, участвующие в развитии репродуктивной системы. Пять генов (*APAF1, ATP11B, EPHA3, MMS22L* и *TMCO5A*) были представлены во всех четырех исследовательских наборах. Их известные функции охватывают поддержание геномной стабильности, регуляцию апоптоза, межклеточные взаимодействия и клеточный гомеостаз. Функциональная характеристика общих генов позволила выделить биологические процессы, связанные с эмбриональным развитием, формированием репродуктивной и нервной систем. Дальнейшее изучение этих генов представляет интерес для понимания взаимосвязи репродуктивного и соматического старения.

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны с экспериментальной оценкой функциональной значимости выявленных генетических вариантов и регуляторных элементов, расширением сравнительных выборок видов и проверкой кандидатных вариантов соболя в независимых популяциях. Полученные данные также могут быть использованы при разработке генетических подходов к селекции соболя и интерпретации результатов молекулярно-генетической диагностики женского бесплодия.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительно-геномный анализ филогенетически удаленных видов плацентарных млекопитающих (Placentalia) с длительным сохранением репродуктивной функции выявил 150 общих геномных регионов с признаками ускоренной эволюции. Выявленные регионы связаны с генами, участвующими в функционировании репродуктивной и эндокринной систем.
2. У самок соболя с репродуктивным долголетием и высокой плодовитостью выявлены признаки селекции в 73 генах, в том числе связанных с регуляцией репродуктивной функции. Приоритизация вариантов позволила выделить гены *VGLL4*, *COQ7* и *ASPM*, в которых выявлены миссенс-варианты, чаще встречавшиеся у исследуемых самок, чем в группах сравнения.
3. Сравнительно-геномный анализ представителей семейства куньих (Mustelidae) с отложенной имплантацией эмбриона выявил 59 общих геномных регионов с признаками ускоренной эволюции. Выявленные регионы связаны с генами, участвующими в эмбриональном развитии, клеточной адгезии и поддержании плюрипотентности.
4. Сравнительно-геномный анализ зубатых китов (Odontoceti) с продолжительным пострепродуктивным периодом выявил 29 общих геномных регионов с признаками ускоренной эволюции. Выявленные регионы связаны с генами, участвующими в развитии нервной системы, синаптической передаче и регуляции межклеточных взаимодействий.
5. У женщин с остановкой созревания ооцитов и аномалией блестящей оболочки ооцитов выявлены миссенс-варианты в генах *TUBB8* (c.527C>T) и *ZP4* (c.1025T>C) соответственно.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ОНВ – однонуклеотидный вариант

п. н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЦРЭ (CRE, cis-regulatory element) – цис-регуляторный элемент.

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЭУР – эволюционно ускоренный геномный регион

AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; AMPA-рецепторы – ионотропные глутаматные рецепторы

APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) – анафазостимулирующий комплекс/циклосома

ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) – метод анализа доступности хроматина с использованием транспозазы и секвенирования

BP (biological process) – биологический процесс

BWA (Burrows–Wheeler Aligner) – алгоритм выравнивания последовательностей

BWA-MEM – алгоритм выравнивания последовательностей, реализованный в пакете BWA

CA (chromatin accessibility) – участок доступного хроматина

CA-CTCF – участок доступного хроматина, связанный с CTCF

CC (cellular component) – клеточный компонент

cCRE (candidate cis-regulatory element) – кандидатный цис-регуляторный элемент

CDS (coding sequence) – кодирующая последовательность

ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием

CTCF (CCCTC-binding factor) – CTCF-связывающий фактор

dELS (distal enhancer-like signature) – дистальный энхансероподобный элемент

DNase-seq – секвенирование участков хроматина, гиперчувствительных к ДНКазе I

ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) – проект функциональной аннотации элементов генома человека

ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) – Европейское общество репродукции человека и эмбриологии

FDR (false discovery rate) – ожидаемая доля ложных открытий

FeRGI (Female Reproductive Genetics Initiative) – инициатива по генетике женской репродуктивной функции

FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) – число фрагментов на килобазу транскрипта на миллион картированных прочтений

F_{ST} (fixation index) – индекс генетической дифференциации популяций

GATK (Genome Analysis Toolkit) – программный комплекс для анализа геномных данных

GEO (Gene Expression Omnibus) – база данных экспрессии генов

gnomAD (Genome Aggregation Database) – база данных популяционной частоты генетических вариантов

GO (Gene Ontology) – генная онтология

GRCh37/hg19 – референсная сборка генома человека GRCh37, обозначаемая в UCSC Genome Browser как hg19

GRCh38/hg38 – референсная сборка генома человека GRCh38, обозначаемая в UCSC Genome Browser как hg38

GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool) – инструмент функциональной аннотации геномных регионов

GV (germinal vesicle) – стадия зародышевого пузырька ооцита

GVCF (Genomic Variant Call Format) – формат представления геномных вариантов, используемый при совместном генотипировании

GWAS (genome-wide association study) – полногеномное исследование ассоциаций

H3K27ac – ацетилирование лизина 27 гистона H3

H3K4me3 – триметилирование лизина 4 гистона H3

HAGR (Human Ageing Genomic Resources) – ресурс геномных данных о старении человека

HOCOMOCO (Homo sapiens Comprehensive Model Collection) – база данных моделей связывания транскрипционных факторов

K – число генетических компонентов в анализе ADMIXTURE

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) – Киотская энциклопедия генов и геномов

$\log_2$FC ($\log_2$ fold change) – двоичный логарифм кратности изменения экспрессии

MAF (Multiple Alignment Format) – формат множественного выравнивания геномных последовательностей

MF (molecular function) – молекулярная функция

MI (metaphase I) – метафаза I мейоза

MII (metaphase II) – метафаза II мейоза

mTOR (mechanistic target of rapamycin) – механистическая мишень рапамицина

N50 – показатель непрерывности геномной сборки, соответствующий длине последовательности, при которой не менее 50 % общей длины сборки приходится на последовательности не короче указанного значения

PCA (principal component analysis) – анализ главных компонент

pELS (proximal enhancer-like signature) – проксимальный энхансероподобный элемент

PI3K–AKT (phosphoinositide 3-kinase–AKT) – сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы–протеинкиназы B

PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат

PLS (promoter-like signature) – промотороподобный элемент

RNA-seq (RNA sequencing) – секвенирование РНК

RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) – число прочтений на килобазу транскрипта на миллион картированных прочтений

SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) – алгоритм прогнозирования функционального эффекта аминокислотных замен

TGF-β (transforming growth factor beta) – трансформирующий фактор роста β

TSS (transcription start site) – сайт начала транскрипции

UCSC (University of California, Santa Cruz) – Калифорнийский университет в Санта-Крузе; сокращение используется в названии UCSC Genome Browser

VEP (Variant Effect Predictor) – инструмент прогнозирования функциональных последствий генетических вариантов

ΔK – статистический показатель, используемый для определения оптимального числа генетических компонентов в анализе ADMIXTURE

π – нуклеотидное разнообразие

ρ – параметр относительной скорости нуклеотидных замен

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dönertaş H. M., Partridge L. Evolutionary genetics of ageing // Nat. Rev. Genet. 2026. T 27, № 9. C. 708–723.
2. Fushan A. A. и др. Gene expression defines natural changes in mammalian lifespan // Aging Cell. 2015. T. 14, № 3. C. 352–365.
3. Péron G. и др. Variation in actuarial senescence does not reflect life span variation across mammals // PLOS Biol. / под ред. Kirkwood T. B. L. 2019. T. 17, № 9. C. e3000432.
4. Hamilton W. D. The moulding of senescence by natural selection // J. Theor. Biol. 1966. T. 12, № 1. C. 12–45.
5. Kirkwood T. B. L. Evolution of ageing // Nature. 1977. T. 270, № 5635. C. 301–304.
6. Maklakov A. A., Immler S. The Expensive Germline and the Evolution of Ageing // Curr. Biol. 2016. T. 26, № 13. C. R577–R586.
7. Templeman N. M., Murphy C. T. Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways // J. Cell Biol. 2018. T. 217, № 1. C. 93–106.
8. Lemaître J.-F., Ronget V., Gaillard J.-M. Female reproductive senescence across mammals: A high diversity of patterns modulated by life history and mating traits // Mech. Ageing Dev. 2020. T. 192. C. 111377.
9. Ellis S. и др. Postreproductive lifespans are rare in mammals // Ecol. Evol. 2018. T. 8, № 5. C. 2482–2494.
10. Croft D. P. и др. The evolution of prolonged life after reproduction // Trends Ecol. Evol. 2015. T. 30, № 7. C. 407–416.
11. Ellis S. и др. The evolution of menopause in toothed whales // Nature. 2024. T. 627, № 8004. C. 579–585.
12. Partridge L., Gems D. Mechanisms of aging: public or private? // Nat. Rev. Genet. 2002. T. 3, № 3. C. 165–175.
13. Tyshkovskiy A. и др. Distinct longevity mechanisms across and within species and their association with aging // Cell. 2023. T. 186, № 13. C. 2929-2949.e20.
14. Luo S. и др. TGF-β and Insulin Signaling Regulate Reproductive Aging via Oocyte and Germline Quality Maintenance // Cell. 2010. T. 143, № 2. C. 299–312.
15. Ruth K. S. и др. Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing // Nature. 2021. T. 596, № 7872. C. 393–397.
16. Arantes-Oliveira N. и др. Regulation of Life-Span by Germ-Line Stem Cells in *Caenorhabditis elegans* // Science. 2002. T. 295, № 5554. C. 502–505.

17. Hsin H., Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans // Nature. 1999. Т. 399, № 6734. С. 362–366.

18. Lemaître J., Gaillard J. Reproductive senescence: new perspectives in the wild // Biol. Rev. 2017. Т. 92, № 4. С. 2182–2199.

19. Wang X., Wang L., Xiang W. Mechanisms of ovarian aging in women: a review // J. Ovarian Res. 2023. Т. 16, № 1. С. 67.

20. Dong L. и др. Unraveling female reproductive senescence to enhance healthy longevity // Cell Res. 2023. Т. 33, № 1. С. 11–29.

21. Vágási C. I. и др. Is degree of sociality associated with reproductive senescence? A comparative analysis across birds and mammals // Philos. Trans. R. Soc. B. 2021. Т. 376, № 1823. С. 20190744.

22. Williams G. C. PLEIOTROPY, NATURAL SELECTION, AND THE EVOLUTION OF SENESCENCE // Evolution. 1957. Т. 11, № 4. С. 398–411.

23. Lister L. M. и др. Age-Related Meiotic Segregation Errors in Mammalian Oocytes Are Preceded by Depletion of Cohesin and Sgo2 // Curr. Biol. 2010. Т. 20, № 17. С. 1511–1521.

24. Bebbere D. и др. Oocyte aging: looking beyond chromosome segregation errors // J. Assist. Reprod. Genet. 2022. Т. 39, № 4. С. 793–800.

25. Isola J. V. V. и др. A single-cell atlas of the aging mouse ovary // Nat. Aging. 2024. Т. 4, № 1. С. 145–162.

26. Lu H. и др. Aging hallmarks of the primate ovary revealed by spatiotemporal transcriptomics // Protein Cell. 2024. Т. 15, № 5. С. 364–384.

27. Wu M. и др. Spatiotemporal transcriptomic changes of human ovarian aging and the regulatory role of FOXP1 // Nat. Aging. 2024. Т. 4, № 4. С. 527–545.

28. Jin C. и др. Molecular and genetic insights into human ovarian aging from single-nuclei multi-omics analyses // Nat. Aging. 2024. Т. 5, № 2. С. 275–290.

29. Das A., Destouni A. Novel insights into reproductive ageing and menopause from genomics // Hum. Reprod. 2023. Т. 38, № 2. С. 195–203.

30. Stolk L. и др. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways // Nat. Genet. 2012. Т. 44, № 3. С. 260–268.

31. The PRACTICAL Consortium и др. Large-scale genomic analyses link reproductive aging to hypothalamic signaling, breast cancer susceptibility and BRCA1-mediated DNA repair // Nat. Genet. 2015. Т. 47, № 11. С. 1294–1303.

32. Stankovic S. и др. Genetic links between ovarian ageing, cancer risk and de novo mutation rates // Nature. 2024. Т. 633, № 8030. С. 608–614.

33. Farré X. и др. Comparative Analysis of Mammal Genomes Unveils Key Genomic Variability for Human Life Span // Mol. Biol. Evol. / под ред. Nowick K. 2021. Т. 38, № 11. С. 4948–4961.

34. Lu J. Y. и др. Comparative transcriptomics reveals circadian and pluripotency networks as two pillars of longevity regulation // Cell Metab. 2022. Т. 34, № 6. С. 836-856.e5.

35. Huang Z. и др. Duplications of Human Longevity-Associated Genes Across Placental Mammals // Genome Biol. Evol. / под ред. Bazykin G. 2023. Т. 15, № 10. С. evad186.

36. Lynch V. J. и др. Transposon-mediated rewiring of gene regulatory networks contributed to the evolution of pregnancy in mammals // Nat. Genet. 2011. Т. 43, № 11. С. 1154–1159.

37. Lynch V. J. и др. Ancient Transposable Elements Transformed the Uterine Regulatory Landscape and Transcriptome during the Evolution of Mammalian Pregnancy // Cell Rep. 2015. Т. 10, № 4. С. 551–561.

38. Guernsey M. W. и др. Molecular conservation of marsupial and eutherian placentation and lactation // eLife. 2017. Т. 6. С. e27450.

39. Wu J., Yonezawa T., Kishino H. Evolution of Reproductive Life History in Mammals and the Associated Change of Functional Constraints // Genes. 2021. Т. 12, № 5. С. 740.

40. Holloway A. K. и др. Accelerated Evolution of Enhancer Hotspots in the Mammal Ancestor // Mol. Biol. Evol. 2016. Т. 33, № 4. С. 1008–1018.

41. Ferris E. и др. Accelerated Evolution in Distinctive Species Reveals Candidate Elements for Clinically Relevant Traits, Including Mutation and Cancer Resistance // Cell Rep. 2018. Т. 22, № 10. С. 2742–2755.

42. Tollis M. и др. Elephant Genomes Reveal Accelerated Evolution in Mechanisms Underlying Disease Defenses // Mol. Biol. Evol. / под ред. Teeling E. 2021. Т. 38, № 9. С. 3606–3620.

43. Bi X. и др. Lineage-specific accelerated sequences underlying primate evolution // Sci. Adv. 2023. Т. 9, № 22. С. eadc9507.

44. Trigila A. P. и др. Comparative genomics sheds light on mammalian and avian gene regulation and phenotypic evolution // Nat. Commun. 2025. Т. 16, № 1. С. 9111.

45. Ferris E., Gregg C. Parallel Accelerated Evolution in Distant Hibernators Reveals Candidate Cis Elements and Genetic Circuits Regulating Mammalian Obesity // Cell Rep. 2019. Т. 29, № 9. С. 2608-2620.e4.

46. Nakayama D., Makino T. Convergent accelerated evolution of mammal-specific conserved non-coding elements in hibernators // Sci. Rep. 2024. Т. 14, № 1. С. 11754.

47. Shakya S. B., Edwards S. V., Sackton T. B. Convergent evolution of noncoding elements associated with short tarsus length in birds // BMC Biol. 2025. Т. 23, № 1. С. 52.

48. Monakhov V. G. Martes zibellina (Carnivora: Mustelidae) // Mamm. Species. 2011. Т. 43. С. 75–86.

49. Терновский Л.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. 1994. 223 с.

50. Терновская Ю. Г. V Всероссийская научно-практическая Интернет-конференция по соболю. Киров: ВНИИОЗ РАСХН. С. 203–239.

51. Ручкина З.С. Репродуктивный потенциал однолетних соболей в условиях клеточного содержания. Москва, 2005. 132 с.

52. Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin", Moscow, Russia и др. The influence of the age of female and male sables and their compatibility on reproduction indicators // Vet. Zootekhniya Biotekhnologiya. 2023. Т. 3, № 112. С. 132–139.

53. Kuznetsov G. A. и др. Reproductive ability of pastel sables // Russ. Agric. Sci. 2016. Т. 42, № 6. С. 469–471.

54. Beketov S. V. и др. Darkening of the color as a marker sign of reduced reproductive ability of female sable (martes zibellina) and mink (neovison vison) // Ecol. Genet. 2019. Т. 17, № 3. С. 75–86.

55. Zakharova N. N. и др. Fertility and fur color of sable in Yakutia // Krolikovod. Zverovod 2023. № 5. С. 8–14.

56. Орлова Е., Федорова О. НЕБЛАГОПОЛУЧНЫЕ РОДЫ И ОТХОД ЩЕНКОВ ДО РЕГИСТРАЦИИ У ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ РАЗНЫХ ВИДОВ И ПОРОД // Международный Научно-Исследовательский Журнал. ООО Цифра, 2024. С. 9.

57. Kashtanov S. N. и др. The effect of artificial selection for coat color on fitness in a farm population of the sable (Martes zibellina) // Russ. J. Genet. 2008. Т. 44, № 6. С. 727–731.

58. Kashtanov S. N., Lazebny O. E., Imasheva A. G. Changes in correlations between commercially valuable characters of the sable Martes zibellina L. during artificial selection // Russ. J. Genet. 2008. Т. 44, № 11. С. 1355–1357.

59. Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin, Moscow, Russian Federation и др. Productive qualities of sables with different intensity of gray hair // Vet. Zootekhniya Biotekhnologiya. 2024. Т. 11/2, № 131. С. 139–148.

60. Бекетов С. В., Казакова Т. И., Чернова И. Е. Средовые условия как провокационный фон в реализации репродуктивных показателей соболей (Martes zibellina) с разной интенсивностью пигментации волосяного покрова. 2012. Т. 16, № 4–2. С. 1013–1024.

61. Kashtanov S. N., Lazebny O. E., Gracheva S. V. Fitness Characteristics and Allozyme Heterozygosity in an Artificial Population of the Sable Martes zibellina L. // Russ. J. Genet. 2003. Т. 39, № 12. С. 1438–1441.

62. Lagerkvist G., Johansson K., Lundeheim N. Selection for litter size, body weight, and pelt quality in mink (Mustela vison): experimental design and direct response of each trait // J. Anim. Sci. 1993. Т. 71, № 12. С. 3261–3272.

63. Karimi K. и др. Genetic and phenotypic parameters for litter size, survival rate, gestation length, and litter weight traits in American mink1 // J. Anim. Sci. 2018. Т. 96, № 7. С. 2596–2606.

64. Shi H. и др. Genomic Regions Associated with Growth and Reproduction Traits in Pink-Eyed White Mink // Genes. 2024. Т. 15, № 9. С. 1142.

65. Renfree M. B., Shaw G. Diapause // Annu. Rev. Physiol. 2000. Т. 62, № 1. С. 353–375.

66. Lopes F. L., Desmarais J. A., Murphy B. D. Embryonic diapause and its regulation // Reproduction. 2004. Т. 128, № 6. С. 669–678.

67. Van Der Weijden V. A., Bulut-Karslioglu A. Molecular Regulation of Paused Pluripotency in Early Mammalian Embryos and Stem Cells // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Т. 9. С. 708318.

68. Murphy B. Embryonic Diapause: Advances in Understanding the Enigma of Seasonal Delayed Implantation // Reprod. Domest. Anim. 2012. Т. 47, № s6. С. 121–124.

69. Thom M. D., Johnson D. D. P., Macdonald D. W. THE EVOLUTION AND MAINTENANCE OF DELAYED IMPLANTATION IN THE MUSTELIDAE (MAMMALIA: CARNIVORA) // Evolution. 2004. Т. 58, № 1. С. 175–183.

70. Fenelon J. и др. Regulation of diapause in carnivores // Reprod. Domest. Anim. 2017. Т. 52, № S2. С. 12–17.

71. Mead R. A. Delayed implantation in mustelids, with special emphasis on the spotted skunk // J. Reprod. Fertil. Suppl. 1981. Т. 29. С. 11–24.

72. Lindenfors P., Dalèn L., Angerbjörn A. THE MONOPHYLETIC ORIGIN OF DELAYED IMPLANTATION IN CARNIVORES AND ITS IMPLICATIONS // Evolution. 2003. Т. 57, № 8. С. 1952–1956.

73. H. Ferguson S., W. Higdon J., Larivière S. Does seasonality explain the evolution and maintenance of delayed implantation in the family Mustelidae (Mammalia: Carnivora)? // Oikos. 2006. Т. 114, № 2. С. 249–256.

74. Desmarais J. A. и др. The Escape of the Mink Embryo from Obligate Diapause1 // Biol. Reprod. 2004. Т. 70, № 3. С. 662–670.

75. Martinet L., Allain D. Role of the Pineal Gland in the Photoperiodic Control of Reproductive and Non-Reproductive Functions in Mink (*Mustela vison*) // Ciba Foundation Symposium 117 - Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. 1-е изд. / под ред. Evered D., Clark S. Wiley, 1985. С. 170–187.

76. Martinet L., Allain D., Chabi Y. Pineal denervation by cervical sympathetic ganglionectomy suppresses the role of photoperiod on pregnancy or pseudopregnancy, body weight and moulting periods in the mink (*Mustela vison*) // J. Endocrinol. 1985. Т. 107, № 1. С. 31–39.

77. Papke R. L. и др. Control of Luteal Function and Implantation in the Mink by Prolactin23 // J. Anim. Sci. 1980. Т. 50, № 6. С. 1102–1107.

78. Douglas D. A. и др. Luteotropic Hormone Receptors in the Ovary of the Mink (Mustela vison) during Delayed Implantation and Early-Postimplantation Gestation // Biol. Reprod. 1998. Т. 59, № 3. С. 571–578.

79. Fenelon J. C. и др. Polyamine-Mediated Effects of Prolactin Dictate Emergence from Mink Obligate Embryonic Diapause // Biol. Reprod. 2016. Т. 95, № 1. С. 6–6.

80. Fan B. и др. Transcriptomic analysis of ovarian signaling at the emergence of the embryo from obligate diapause in the American mink (Neovison vison) // Anim. Reprod. Sci. 2021. Т. 232. С. 106823.

81. Moreau G. M. и др. Development of Immortalized Endometrial Epithelial and Stromal Cell Lines from the Mink (Mustela Vison) Uterus and their Effects on the Survival in Vitro of Mink Blastocysts in Obligate Diapause1 // Biol. Reprod. 1995. Т. 53, № 3. С. 511–518.

82. Song J. H., Houde A., Murphy B. D. Cloning of leukemia inhibitory factor (LIF) and its expression in the uterus during embryonic diapause and implantation in the mink (Mustela vison) // Mol. Reprod. Dev. 1998. Т. 51, № 1. С. 13–21.

83. Cha J. и др. A new role for *muscle segment homeobox* genes in mammalian embryonic diapause // Open Biol. 2013. Т. 3, № 4. С. 130035.

84. Cao X. и др. Transcriptome Changes in the Mink Uterus during Blastocyst Dormancy and Reactivation // Int. J. Mol. Sci. 2019. Т. 20, № 9. С. 2099.

85. Volozonoka L. и др. A systematic review and standardized clinical validity assessment of genes involved in female reproductive failure // Reproduction. 2022. Т. 163, № 6. С. 351–363.

86. Tatone C. и др. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing // Hum. Reprod. Update. 2008. Т. 14, № 2. С. 131–142.

87. Igarashi H., Takahashi T., Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies // Reprod. Med. Biol. 2015. Т. 14, № 4. С. 159–169.

88. Feng R. и др. Mutations in *TUBB8* and Human Oocyte Meiotic Arrest // N. Engl. J. Med. 2016. Т. 374, № 3. С. 223–232.

89. Chen B. и др. Novel mutations and structural deletions in *TUBB8*: expanding mutational and phenotypic spectrum of patients with arrest in oocyte maturation, fertilization or early embryonic development // Hum. Reprod. 2017. Т. 32, № 2. С. 457–464.

90. Chen B. и др. The comprehensive mutational and phenotypic spectrum of TUBB8 in female infertility // Eur. J. Hum. Genet. 2019. Т. 27, № 2. С. 300–307.

91. Huang L. и др. Mutation analysis of the TUBB8 gene in nine infertile women with oocyte maturation arrest // Reprod. Biomed. Online. 2017. Т. 35, № 3. С. 305–310.

92. Zhao L. и др. Identification novel mutations in TUBB8 in female infertility and a novel phenotype of large polar body in oocytes with TUBB8 mutations // J. Assist. Reprod. Genet. 2020. Т. 37, № 8. С. 1837–1847.

93. Maddirevula S. и др. Female Infertility Caused by Mutations in the Oocyte-Specific Translational Repressor PATL2 // Am. J. Hum. Genet. 2017. Т. 101, № 4. С. 603–608.

94. Chen B. и др. Biallelic Mutations in PATL2 Cause Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Arrest // Am. J. Hum. Genet. 2017. Т. 101, № 4. С. 609–615.

95. Van Der Kelen A. и др. A comprehensive review for defining cut-off values of oocyte, zygote, and embryo maturation arrest (OZEMA) due to maternal-effect genes: towards the establishment of clinical criteria // Hum. Reprod. 2026. Т. 41, № 7. С. 1207–1219.

96. Solovova O. A., Chernykh V. B. Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest // Genes. 2022. Т. 13, № 11. С. 1920.

97. Wu L. и др. Novel mutations in PATL2: expanding the mutational spectrum and corresponding phenotypic variability associated with female infertility // J. Hum. Genet. 2019. Т. 64, № 5. С. 379–385.

98. Zhao L. и др. Biallelic mutations in CDC20 cause female infertility characterized by abnormalities in oocyte maturation and early embryonic development // Protein Cell. 2020. Т. 11, № 12. С. 921–927.

99. Xu Y. и др. Mutations in PADI6 Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest // Am. J. Hum. Genet. 2016. Т. 99, № 3. С. 744–752.

100. Wang W. и др. Bi-allelic pathogenic variants in PABPC1L cause oocyte maturation arrest and female infertility // EMBO Mol. Med. 2023. Т. 15, № 6. С. EMMM202217177.

101. Innocenti F. и др. Maternal effect factors that contribute to oocytes developmental competence: an update // J. Assist. Reprod. Genet. 2022. Т. 39, № 4. С. 861–871.

102. Huang H.-L. и др. Mutant ZP1 in Familial Infertility // N. Engl. J. Med. 2014. Т. 370, № 13. С. 1220–1226.

103. Dai C. и др. ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility // Genet. Med. 2019. Т. 21, № 2. С. 431–440.

104. Sang Q. и др. Homozygous Mutations in WEE2 Cause Fertilization Failure and Female Infertility // Am. J. Hum. Genet. 2018. Т. 102, № 4. С. 649–657.

105. Alazami A. M. и др. TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality // Genome Biol. 2015. Т. 16, № 1. С. 240.

106. Croft D. P. и др. Reproductive Conflict and the Evolution of Menopause in Killer Whales // Curr. Biol. 2017. Т. 27, № 2. С. 298–304.

107. Winkler I., Goncalves A. Do mammals have menopause? // Cell. 2023. Т. 186, № 22. С. 4729–4733.

108. Chapman S. N. и др. Asian elephants exhibit post-reproductive lifespans // BMC Evol. Biol. 2019. Т. 19, № 1. С. 193.

109. Lahdenperä M., Mar K. U., Lummaa V. Reproductive cessation and post-reproductive lifespan in Asian elephants and pre-industrial humans // Front. Zool. 2014. Т. 11, № 1. С. 54.

110. Wood B. M. и др. Demographic and hormonal evidence for menopause in wild chimpanzees // Science. 2023. Т. 382, № 6669. С. eadd5473.

111. White L. C. и др. Avoidance of reproductive conflict and the evolution of menopause in chimpanzees // R. Soc. Open Sci. 2025. Т. 12, № 6. С. 250385.

112. Gidlöf S., Engberg H., Jakson I. Menopause in nonhuman mammals–What does it mean for the gynecologist? // Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2026. Т. 105, № 2. С. 212–214.

113. Photopoulou T. и др. Evidence for a postreproductive phase in female false killer whales Pseudorca crassidens // Front. Zool. 2017. Т. 14, № 1. С. 30.

114. Foster E. A. и др. Adaptive Prolonged Postreproductive Life Span in Killer Whales // Science. 2012. Т. 337, № 6100. С. 1313–1313.

115. Brent L. J. N. и др. Ecological Knowledge, Leadership, and the Evolution of Menopause in Killer Whales // Curr. Biol. 2015. Т. 25, № 6. С. 746–750.

116. Nattrass S. и др. Postreproductive killer whale grandmothers improve the survival of their grandoffspring // Proc. Natl. Acad. Sci. 2019. Т. 116, № 52. С. 26669–26673.

117. Nielsen M. L. K. и др. A long postreproductive life span is a shared trait among genetically distinct killer whale populations // Ecol. Evol. 2021. Т. 11, № 13. С. 9123–9136.

118. McCormack J. L. и др. Lack of intergenerational reproductive conflict, rather than lack of inclusive fitness benefits, explains absence of post-reproductive lifespan in long-finned pilot whales // Behav. Ecol. / под ред. Le Roux A. 2023. Т. 34, № 6. С. 950–959.

119. Foote A. D. и др. Genome-culture coevolution promotes rapid divergence of killer whale ecotypes // Nat. Commun. 2016. Т. 7, № 1. С. 11693.

120. Tollis M. и др. Return to the Sea, Get Huge, Beat Cancer: An Analysis of Cetacean Genomes Including an Assembly for the Humpback Whale (Megaptera novaeangliae) // Mol. Biol. Evol. / под ред. Shapiro B. 2019. Т. 36, № 8. С. 1746–1763.

121. Ritchie M. D. и др. Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions // Nat. Rev. Genet. 2015. Т. 16, № 2. С. 85–97.

122. Hasin Y., Seldin M., Lusis A. Multi-omics approaches to disease // Genome Biol. 2017. Т. 18, № 1. С. 83.

123. Allard J. B., Kumar S. The genetic foundations of convergent traits // Nat. Rev. Genet. 2026. Т. 27, № 7. С. 563–578.

124. Hoitinga P. K., Birkeland S. Pathway-level convergence: an underexplored aspect of convergent evolution // Trends Genet. 2025. Т. 41, № 10. С. 853–867.

125. Wei J. и др. Convergent genome evolution shaped the emergence of terrestrial animals // Nature. 2026. Т. 649, № 8097. С. 638–646.

126. Martínez-Redondo G. I. и др. Convergent genomic trajectories shape adaptation to life on land across animal lineages // Nat. Commun. 2026. Т. 17, № 1. С. 8782.

127. Wright S. N., Yang J., Ideker T. Common and rare genetic variants show network convergence for a majority of human traits // EMBO Rep. 2026. Т. 27, № 8. С. 1918–1943.

128. Khatri P., Sirota M., Butte A. J. Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges // PLoS Comput. Biol. / под ред. Ouzounis C. A. 2012. Т. 8, № 2. С. e1002375.

129. Li W. и др. Beyond standard pipeline and $p < 0.05$ in pathway enrichment analyses // Comput. Biol. Chem. 2021. Т. 92. С. 107455.

130. Doderer M. S. и др. Pathway Distiller - multisource biological pathway consolidation // BMC Genomics. 2012. Т. 13, № S6. С. S18.

131. Derežanin L. и др. Multiple types of genomic variation contribute to adaptive traits in the mustelid subfamily Guloninae // Mol. Ecol. 2022. Т. 31, № 10. С. 2898–2919.

132. Raney B. J. и др. The UCSC Genome Browser database: 2024 update // Nucleic Acids Res. 2024. Т. 52, № D1. С. D1082–D1088.

133. Campos F. A. и др. Female reproductive aging in seven primate species: Patterns and consequences // Proc. Natl. Acad. Sci. 2022. Т. 119, № 20. С. e2117669119.

134. DelGiudice G. D., Lenarz M. S., Powell M. C. Age-Specific Fertility and Fecundity in Northern Free-Ranging White-Tailed Deer: Evidence for Reproductive Senescence? // J. Mammal. 2007. Т. 88, № 2. С. 427–435.

135. Gicquel M. и др. Early-life adversity predicts performance and fitness in a wild social carnivore // J. Anim. Ecol. 2022. Т. 91, № 10. С. 2074–2086.

136. Le Boeuf B., Condit R., Reiter J. Lifetime reproductive success of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) // Can. J. Zool. 2019. Т. 97, № 12. С. 1203–1217.

137. Payne A. R. и др. Reproductive success and offspring survival decline for female elephant seals past prime age // J. Anim. Ecol. 2025. Т. 94, № 3. С. 423–435.

138. van Utrecht-Cock, C. N. Age determination and reproduction of female Fin Whales Balaenoptera physalus (Linnaeus, 1758), with special regard to baleen plates and ovaries // Bijdr. Tot Dierkd. 1965. Т. 35, № 1. С. 39–87.

139. Johnson R. L., Kapsalis E. Ageing, infecundity and reproductive senescence in free-ranging female rhesus monkeys // Reproduction. 1995. Т. 105, № 2. С. 271–278.

140. Hoffman C. L. и др. Terminal investment and senescence in rhesus macaques (Macaca mulatta) on Cayo Santiago // Behav. Ecol. 2010. Т. 21, № 5. С. 972–978.

141. Weladji R. B. и др. Age-related reproductive effort in reindeer (Rangifer tarandus): evidence of senescence // Oecologia. 2002. Т. 131, № 1. С. 79–82.

142. Sharp S. P., Clutton-Brock T. H. Reproductive senescence in a cooperatively breeding mammal // J. Anim. Ecol. 2010. Т. 79, № 1. С. 176–183.

143. Packer C., Tatar M., Collins A. Reproductive cessation in female mammals // Nature. 1998. Т. 392, № 6678. С. 807–811.

144. Bowen W. D. и др. Reproductive performance in grey seals: age-related improvement and senescence in a capital breeder // J. Anim. Ecol. 2006. Т. 75, № 6. С. 1340–1351.

145. Trillmich F., Geißler E., Guenther A. Senescence and costs of reproduction in the life history of a small precocial species // Ecol. Evol. 2019. Т. 9, № 12. С. 7069–7079.

146. Karniski C., Krzyszczyk E., Mann J. Senescence impacts reproduction and maternal investment in bottlenose dolphins // Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 2018. Т. 285, № 1883. С. 20181123.

147. Alberts S. C. и др. Reproductive aging patterns in primates reveal that humans are distinct // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Т. 110, № 33. С. 13440–13445.

148. Heldstab S. A. и др. Geographical Origin, Delayed Implantation, and Induced Ovulation Explain Reproductive Seasonality in the Carnivora // J. Biol. Rhythms. 2018. Т. 33, № 4. С. 402–419.

149. Kumar S. и др. TimeTree 5: An Expanded Resource for Species Divergence Times // Mol. Biol. Evol. 2022. Т. 39, № 8. С. msac174.

150. Upham N. S., Esselstyn J. A., Jetz W. Inferring the mammal tree: Species-level sets of phylogenies for questions in ecology, evolution, and conservation // PLOS Biol. / под ред. Tanentzap A. J. 2019. Т. 17, № 12. С. e3000494.

151. Cock P. J. A. и др. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics // Bioinformatics. 2009. Т. 25, № 11. С. 1422–1423.

152. Rambaut, Andrew. FigTree v1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2018.

153. Siepel A. и др. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes // Genome Res. 2005. Т. 15, № 8. С. 1034–1050.

154. Hubisz M. J., Pollard K. S., Siepel A. PHAST and RPHAST: phylogenetic analysis with space/time models // Brief. Bioinform. 2011. Т. 12, № 1. С. 41–51.

155. Pollard K. S. и др. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies // Genome Res. 2010. Т. 20, № 1. С. 110–121.

156. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

157. Harris C. R. и др. Array programming with NumPy // Nature. 2020. Т. 585, № 7825. С. 357–362.

158. Phipson B., Smyth G. K. Permutation P-values Should Never Be Zero: Calculating Exact P-values When Permutations Are Randomly Drawn // Stat. Appl. Genet. Mol. Biol. 2010. Т. 9, № 1.

159. Python Software Foundation. Python Language Reference. Python Software Foundation, 2022.

160. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods // Biom. Bull. 1945. Т. 1, № 6. С. 80.

161. Virtanen P. и др. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // Nat. Methods. 2020. Т. 17, № 3. С. 261–272.

162. Amemiya H. M., Kundaje A., Boyle A. P. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome // Sci. Rep. 2019. Т. 9, № 1. С. 9354.

163. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing // J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol. 1995. Т. 57, № 1. С. 289–300.

164. Quinlan A. R., Hall I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features // Bioinformatics. 2010. Т. 26, № 6. С. 841–842.

165. McLean C. Y. и др. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions // Nat. Biotechnol. 2010. Т. 28, № 5. С. 495–501.

166. The ENCODE Project Consortium и др. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes // Nature. 2020. Т. 583, № 7818. С. 699–710.

167. Zou Z., Ohta T., Oki S. ChIP-Atlas 3.0: a data-mining suite to explore chromosome architecture together with large-scale regulome data // Nucleic Acids Res. 2024. Т. 52, № W1. С. W45–W53.

168. Villar D. и др. Enhancer Evolution across 20 Mammalian Species // Cell. 2015. Т. 160, № 3. С. 554–566.

169. Zhao H. и др. CrossMap: a versatile tool for coordinate conversion between genome assemblies // Bioinformatics. 2014. Т. 30, № 7. С. 1006–1007.

170. Manakhov A. D. и др. Genetic Variability of *MAOA* Gene among Aggressive Animals from the Non-Canonical Behavioral Model *Neogale vison* // Генетика. 2023. Т. 59, № 6. С. 728–732.

171. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // Bioinformatics. 2009. Т. 25, № 14. С. 1754–1760.

172. Li H. и др. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. Т. 25, № 16. С. 2078–2079.

173. Zhang Y. и др. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) // Genome Biol. 2008. Т. 9, № 9. С. R137.

174. Kolberg L. и др. g:Profiler–interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update) // Nucleic Acids Res. 2023. Т. 51, № W1. С. W207–W212.

175. Supek F. и др. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms // PLoS ONE / под ред. Gibas C. 2011. Т. 6, № 7. С. e21800.

176. Jain A., Tuteja G. TissueEnrich: Tissue-specific gene enrichment analysis // Bioinformatics / под ред. Kelso J. 2019. Т. 35, № 11. С. 1966–1967.

177. Uhlén M. и др. Tissue-based map of the human proteome // Science. 2015. Т. 347, № 6220. С. 1260419.

178. Rauluseviciute I. и др. JASPAR 2024: 20th anniversary of the open-access database of transcription factor binding profiles // Nucleic Acids Res. 2024. Т. 52, № D1. С. D174–D182.

179. Vorontsov I. E. и др. HOCOMOCO in 2024: a rebuild of the curated collection of binding models for human and mouse transcription factors // Nucleic Acids Res. 2024. Т. 52, № D1. С. D154–D163.

180. Korhonen J. H. и др. Fast motif matching revisited: high-order PWMs, SNPs and indels // Bioinformatics / под ред. Valencia A. 2017. Т. 33, № 4. С. 514–521.

181. Tareen A., Kinney J. B. Logomaker: beautiful sequence logos in Python // Bioinformatics / под ред. Valencia A. 2020. Т. 36, № 7. С. 2272–2274.

182. Schneider T. D., Stephens R. M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences // Nucleic Acids Res. 1990. Т. 18, № 20. С. 6097–6100.

183. Hunter J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment // Comput. Sci. Eng. 2007. Т. 9, № 3. С. 90–95.

184. McKinney W. Data Structures for Statistical Computing in Python. Austin, Texas, 2010. С. 56–61.

185. Залекер В. Л. Материалы по половому циклу соболя // Труды ВНИИ Охотничьего Промысла. 1950. № 9. С. 135–151.

186. Раевский В. В. Жизнь кондо-сосвинского соболя. Москва: Главное управление по заповедникам, 1947. 222 с.

187. Баранов В. А. Особенности воспроизводительной способности соболей. 2023.

188. Сафронов В. М. Плодовитость соболей Якутии // Состояние и использование ресурсов соболя в России. 2004. С. 89–95.

189. Терновская Ю. Г. Плодовитость клеточных соболей Салтыковского зверосовхоза // Кролиководство И Звероводство. 1994. № 3. С. 12–14.

190. Monakhov V. G. Продолжительность жизни соболей в природных условиях // Зоологический Журнал. 2011. Т. 90, № 5. С. 620–625.

191. Терновская Ю. Г. Долголетие и репродуктивные особенности соболей // Бюллетень Московского Общества Испытателей Природы. 2005. Т. 110, № 3. С. 25–31.

192. Манахов, А. Д. Геномный анализ представителей семейства куньих (Mustelidae): Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2022.

193. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM: arXiv:1303.3997. arXiv, 2013.

194. Broad Institute. MarkDuplicates (Picard). GATK Documentation, 2026.

195. McKenna A. и др. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // Genome Res. 2010. Т. 20, № 9. С. 1297–1303.

196. Chang C. C. и др. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets // Gigascience. 2015. Т. 4, № 1. С. s13742-015-0047–0048.

197. Alexander D. H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals // Genome Res. 2009. Т. 19, № 9. С. 1655–1664.

198. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol. 2005. Т. 14, № 8. С. 2611–2620.

199. Purcell S. и др. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses // Am. J. Hum. Genet. 2007. Т. 81, № 3. С. 559–575.

200. Danecek P. и др. The variant call format and VCFtools // Bioinformatics. 2011. Т. 27, № 15. С. 2156–2158.

201. Cingolani P. и др. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w^{1118}; iso-2; iso-3 // Fly (Austin). 2012. Т. 6, № 2. С. 80–92.

202. McLaren W. и др. The Ensembl Variant Effect Predictor // Genome Biol. 2016. Т. 17, № 1. С. 122.

203. Katoh K., Standley D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability // Mol. Biol. Evol. 2013. Т. 30, № 4. С. 772–780.

204. Wheeler T. J., Clements J., Finn R. D. Skylign: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models // BMC Bioinformatics. 2014. Т. 15, № 1. С. 7.

205. Karczewski K. J. и др. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans // Nature. 2020. Т. 581, № 7809. С. 434–443.

206. Ng P. C. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function // Nucleic Acids Res. 2003. Т. 31, № 13. С. 3812–3814.

207. Adzhubei I. A. и др. A method and server for predicting damaging missense mutations // Nat. Methods. 2010. Т. 7, № 4. С. 248–249.

208. Sievers F. и др. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Mol. Syst. Biol. 2011. Т. 7, № 1. С. MSB201175.

209. Paysan-Lafosse T. и др. InterPro in 2022 // Nucleic Acids Res. 2023. Т. 51, № D1. С. D418–D427.

210. Abramson J. и др. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // Nature. 2024. Т. 630, № 8016. С. 493–500.

211. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.1 [Электронный ресурс]. – Schrödinger, LLC. – URL: https://www.pymol.org/ (дата обращения: 18.09.2026). Schrödinger, LLC, 2026.

212. Untergasser A. и др. Primer3–new capabilities and interfaces // Nucleic Acids Res. 2012. Т. 40, № 15. С. e115–e115.

213. Zhang Y. и др. Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions // Mol. Cell. 2018. Т. 72, № 6. С. 1021-1034.e4.

214. Yan R. и др. Decoding dynamic epigenetic landscapes in human oocytes using single-cell multi-omics sequencing // Cell Stem Cell. 2021. Т. 28, № 9. С. 1641-1656.e7.

215. Dang Y. и др. Tracing the expression of circular RNAs in human pre-implantation embryos // Genome Biol. 2016. Т. 17, № 1. С. 130.

216. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2026.

217. Wickham H. ggplot2. Cham: Springer International Publishing, 2016.

218. Van Der Kelen A. и др. A systematic review and evidence assessment of monogenic gene–disease relationships in human female infertility and differences in sex development // Hum. Reprod. Update. 2023. Т. 29, № 2. С. 218–232.

219. de Magalhães J. P. и др. Human Ageing Genomic Resources: updates on key databases in ageing research // Nucleic Acids Res. 2024. Т. 52, № D1. С. D900–D908.

220. Zhou Y. и др. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets // Nat. Commun. 2019. Т. 10, № 1. С. 1523.

221. Ragueneau E. и др. The Reactome Knowledgebase 2026 // Nucleic Acids Res. 2026. Т. 54, № D1. С. D673–D681.

222. Kanehisa M. и др. KEGG: biological systems database as a model of the real world // Nucleic Acids Res. 2025. Т. 53, № D1. С. D672–D677.

223. Agrawal A. и др. WikiPathways 2024: next generation pathway database // Nucleic Acids Res. 2024. Т. 52, № D1. С. D679–D689.

224. Ma Y.-F. и др. OrthReg: a tool to predict *cis*-regulatory elements based on cross-species orthologous sequence conservation // Zool. Res. 2020. Т. 41, № 4. С. 471–475.

225. Martin A., Orgogozo V. THE LOCI OF REPEATED EVOLUTION: A CATALOG OF GENETIC HOTSPOTS OF PHENOTYPIC VARIATION: PERSPECTIVE // Evolution. 2013. С. n/a-n/a.

226. Stern D. L. The genetic causes of convergent evolution // Nat. Rev. Genet. 2013. Т. 14, № 11. С. 751–764.

227. Cao D. и др. ZBTB20 is required for anterior pituitary development and lactotrope specification // Nat. Commun. 2016. Т. 7, № 1. С. 11121.

228. Han Q. и др. ZBTB20 Regulates Prolactin Expression and Lactotrope Function in Adult Mice // Endocrinology. 2022. Т. 163, № 12. С. bqac181.

229. Guan J. и др. Establishing the role of ZBTB20 mutations in GnRH deficiency and impaired neurogenesis in the subventricular zone: a human cohort and animal model study // eBioMedicine. 2026. Т. 131. С. 106416.

230. Yerushalmi G. M. и др. ABCC4 is a PGE2 efflux transporter in the ovarian follicle: A mediator of ovulation and a potential non-hormonal contraceptive target // FASEB J. 2023. Т. 37, № 4. С. e22858.

231. Mbarek H. и др. Genome-wide association study meta-analysis of dizygotic twinning illuminates genetic regulation of female fecundity // Hum. Reprod. 2024. Т. 39, № 1. С. 240–257.

232. Yang Y. и др. *FANCL* gene mutations in premature ovarian insufficiency // Hum. Mutat. 2020. Т. 41, № 5. С. 1033–1041.

233. Huang C. и др. Zfhx3 is required for proper spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis I in mice // Front. Cell Dev. Biol. 2026. Т. 14. С. 1811072.

234. Thomas C. и др. Ex vivo imaging reveals the spatiotemporal control of ovulation // Nat. Cell Biol. 2024. Т. 26, № 11. С. 1997–2008.

235. Buensuceso A. V., Deroo B. J. The Ephrin Signaling Pathway Regulates Morphology and Adhesion of Mouse Granulosa Cells In Vitro1 // Biol. Reprod. 2013. Т. 88, № 1.

236. Nakamura M. и др. Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. // Endocrinology. 1993. Т. 133, № 2. С. 538–544.

237. McCoy M. J., Fire A. Z. Intron and gene size expansion during nervous system evolution // BMC Genomics. 2020. Т. 21, № 1. С. 360.

238. McCoy M. J., Fire A. Z. Parallel gene size and isoform expansion of ancient neuronal genes // Curr. Biol. 2024. Т. 34, № 8. С. 1635-1645.e3.

239. Dorfman M. D. и др. Loss of Ntrk2/Kiss1r Signaling in Oocytes Causes Premature Ovarian Failure // Endocrinology. 2014. Т. 155, № 8. С. 3098–3111.

240. Reis F. M. Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human decidua // Mol. Hum. Reprod. 2002. Т. 8, № 4. С. 356–362.

241. Yasui Y. и др. Expression of Prolactin-Releasing Peptide in Human Placenta and Decidua. // Endocr. J. 2001. Т. 48, № 3. С. 397–401.

242. Salameh A. I., Hübner C. A., Boron W. F. Role of Cl^- –HCO_3^- exchanger AE3 in intracellular pH homeostasis in cultured murine hippocampal neurons, and in crosstalk to adjacent astrocytes // J. Physiol. 2017. Т. 595, № 1. С. 93–124.

243. Qin X. и др. Serotonin/HTR1E signaling blocks chronic stress-promoted progression of ovarian cancer // Theranostics. 2021. Т. 11, № 14. С. 6950–6965.

244. Zhou J. и др. Accelerated reproductive aging in females lacking a novel centromere protein SYCP2L // Hum. Mol. Genet. 2015. Т. 24, № 22. С. 6505–6514.

245. Little T. M., Jordan P. W. PLK1 is required for chromosome compaction and microtubule organization in mouse oocytes // Mol. Biol. Cell / под ред. Walczak C. 2020. Т. 31, № 12. С. 1206–1217.

246. Li M., Wu Y., Caron K. M. Haploinsufficiency for Adrenomedullin Reduces Pinopodes and Diminishes Uterine Receptivity in Mice1 // Biol. Reprod. 2008. Т. 79, № 6. С. 1169–1175.

247. Murphy B. D. и др. Interactions between melatonin and prolactin during gestation in mink (*Mustela vison*) // Reproduction. 1990. Т. 89, № 2. С. 423–429.

248. Wächter J., Shannon M. J., Beristain A. G. Transcriptomic mapping of the metzincin landscape in human trophoblasts // Gene Expr. Patterns. 2022. Т. 46. С. 119283.

249. Li Q. и др. Bone Morphogenetic Protein 2 Functions via a Conserved Signaling Pathway Involving Wnt4 to Regulate Uterine Decidualization in the Mouse and the Human // J. Biol. Chem. 2007. Т. 282, № 43. С. 31725–31732.

250. Lee K. Y. и др. Bmp2 Is Critical for the Murine Uterine Decidual Response // Mol. Cell. Biol. 2007. Т. 27, № 15. С. 5468–5478.

251. Nosrati M. и др. Whole genome sequence analysis to detect signatures of positive selection for high fecundity in sheep // Reprod. Domest. Anim. 2019. Т. 54, № 2. С. 358–364.

252. Zhu M. и др. The genetic characterization of germplasm and identification of the litter size trait associated candidate genes in Dexin mutton and fine-wool sheep // Front. Genet. 2024. Т. 15. С. 1457634.

253. Chen C. и др. Integrated multi-population selection-signature scans identify putative functional genes influencing litter size in jishen black pigs // BMC Genomics. 2026. Т. 27, № 1. С. 761.

254. Yurchenko A. A. и др. Scans for signatures of selection in Russian cattle breed genomes reveal new candidate genes for environmental adaptation and acclimation // Sci. Rep. 2018. Т. 8, № 1. С. 12984.

255. Yudin N. S., Larkin D. M. Candidate genes for domestication and resistance to cold climate according to whole genome sequencing data of Russian cattle and sheep breeds // Vavilov J. Genet. Breed. 2023. Т. 27, № 5. С. 463–470.

256. Liu J. и др. The Anaphase-promoting Complex/Cyclosome Inhibitor Emi2 Is Essential for Meiotic but Not Mitotic Cell Cycles // J. Biol. Chem. 2006. Т. 281, № 46. С. 34736–34741.

257. Choi T. и др. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. Т. 93, № 14. С. 7032–7035.

258. Xu X.-L. и др. The Microtubule-Associated Protein ASPM Regulates Spindle Assembly and Meiotic Progression in Mouse Oocytes // PLoS ONE / под ред. Wang H. 2012. Т. 7, № 11. С. e49303.

259. Mori M. и др. Loss of abnormal spindle-like, microcephaly-associated (Aspm) disrupts female folliculogenesis in mice during maturation and aging // Reprod. Biol. 2022. Т. 22, № 3. С. 100673.

260. Lapointe J., Hekimi S. Early Mitochondrial Dysfunction in Long-lived Mclk1+/- Mice // J. Biol. Chem. 2008. Т. 283, № 38. С. 26217–26227.

261. Vojtek M., Chambers I. Loss of *Resf1* reduces the efficiency of embryonic stem cell self-renewal and germline entry // Life Sci. Alliance. 2021. Т. 4, № 12. С. e202101190.

262. The International Mouse Phenotyping Consortium и др. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes // Nature. 2016. Т. 537, № 7621. С. 508–514.

263. Sun X. и др. The opposite effects of VGLL1 and VGLL4 genes on granulosa cell proliferation and apoptosis of hen ovarian prehierarchical follicles // Theriogenology. 2022. Т. 181. С. 95–104.

264. Kim J. H., Li H., Stallcup M. R. CoCoA, a Nuclear Receptor Coactivator which Acts through an N-Terminal Activation Domain of p160 Coactivators // Mol. Cell. 2003. Т. 12, № 6. С. 1537–1549.

265. Nthiga T. M. и др. CALCOCO1 acts with VAMP-associated proteins to mediate ER-phagy // EMBO J. 2020. Т. 39, № 15. С. EMBJ2019103649.

266. Yaman E. и др. RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange // FEBS J. 2009. Т. 276, № 16. С. 4607–4616.

267. Machon O. и др. Meis2 is essential for cranial and cardiac neural crest development // BMC Dev. Biol. 2015. Т. 15, № 1. С. 40.

268. Tepekoy F., Akkoyunlu G., Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation // J. Assist. Reprod. Genet. 2015. Т. 32, № 3. С. 337–346.

269. Chen R. и др. Analyzing embryo dormancy at single-cell resolution reveals dynamic transcriptional responses and activation of integrin-Yap/Taz prosurvival signaling // Cell Stem Cell. 2024. Т. 31, № 9. С. 1262-1279.e8.

270. Moldovan G. E. и др. YAP1 and WWTR1 are required for murine pregnancy initiation // Reproduction. 2024. Т. 169, № 1. С. e240355.

271. Ma X. и др. The Uterine Melatonergic Systems of AANAT and Melatonin Membrane Receptor 2 (MT2) Are Essential for Endometrial Receptivity and Early Implantation in Mice // Int. J. Mol. Sci. 2023. Т. 24, № 8. С. 7127.

272. Paudel S. и др. Temporal and spatial expression of adrenomedullin and its receptors in the porcine uterus and peri-implantation conceptuses // Biol. Reprod. 2021. Т. 105, № 4. С. 876–891.

273. Zhang Y. и др. Expression and Regulation of Dickkopf2 During Periimplantation in Mice // J. Reprod. Dev. 2009. Т. 55, № 1. С. 17–22.

274. Chen J. и др. Abnormal cGMP-dependent protein kinase I-mediated decidualization in preeclampsia // Hypertens. Res. 2021. Т. 44, № 3. С. 318–324.

275. Ramesh S. T. и др. BMP2K phosphorylates AP -2 and regulates clathrin-mediated endocytosis // Traffic. 2021. Т. 22, № 11. С. 377–396.

276. Haouzi D. и др. Global, Survival, and Apoptotic Transcriptome during Mouse and Human Early Embryonic Development // BioMed Res. Int. 2018. Т. 2018. С. 1–16.

277. Harmar A. J. и др. The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei // Cell. 2002. Т. 109, № 4. С. 497–508.

278. Harwood B. N. и др. Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos // Dev. Dyn. 2008. Т. 237, № 4. С. 1099–1111.

279. Ouyang Y.-B. и др. Reduced Body Weight and Increased Postimplantation Fetal Death in Tyrosylprotein Sulfotransferase-1-deficient Mice // J. Biol. Chem. 2002. Т. 277, № 26. С. 23781–23787.

280. Nguyen H. и др. Deletion of *Orc4* during oogenesis severely reduces polar body extrusion and blocks zygotic DNA replication // Biol. Reprod. 2022. Т. 106, № 4. С. 730–740.

281. Labelle-Dumais C. и др. Impaired Progesterone Production in Nr5a2+/− Mice Leads to a Reduction in Female Reproductive Function1 // Biol. Reprod. 2007. Т. 77, № 2. С. 217–225.

282. Lai F. и др. NR5A2 connects zygotic genome activation to the first lineage segregation in totipotent embryos // Cell Res. 2023. Т. 33, № 12. С. 952–966.

283. Seong E. и др. Mutations in *VPS13D* lead to a new recessive ataxia with spasticity and mitochondrial defects // Ann. Neurol. 2018. Т. 83, № 6. С. 1075–1088.

284. Gupta S. K. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans // J. Reprod. Immunol. 2015. Т. 108. С. 90–97.

285. Lefievre L. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human // Hum. Reprod. 2004. Т. 19, № 7. С. 1580–1586.

286. Chiu P. C. N. и др. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa // Biol. Reprod. 2008. Т. 79, № 5. С. 869–877.

287. Wassarman P. M., Litscher E. S. Zona Pellucida Genes and Proteins: Essential Players in Mammalian Oogenesis and Fertility // Genes. 2021. Т. 12, № 8. С. 1266.

288. Wei X. и др. Mutations in *ZP4* are associated with abnormal zona pellucida and female infertility // J. Clin. Pathol. 2022. Т. 75, № 3. С. 201–204.

289. Morgan A. A., Rubenstein E. Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyproline Sequences in the Human Proteome // PLoS ONE / под ред. Casarini D. E. 2013. Т. 8, № 1. С. e53785.

290. Lamas-Toranzo I. и др. ZP4 confers structural properties to the zona pellucida essential for embryo development // eLife. 2019. Т. 8. С. e48904.

291. Margalit M. и др. Genetic and physiological study of morphologically abnormal human zona pellucida // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2012. Т. 165, № 1. С. 70–76.

292. Yang P. и др. Novel zona pellucida gene variants identified in patients with oocyte anomalies // Fertil. Steril. 2017. Т. 107, № 6. С. 1364–1369.

293. UK10K Consortium и др. Timing, rates and spectra of human germline mutation // Nat. Genet. 2016. Т. 48, № 2. С. 126–133.

294. Lecoquierre F. и др. Parental germline mosaicism in genome-wide phased de novo variants: Recurrence risk assessment and implications for precision genetic counselling // PLOS Genet. / под ред. Glinton, K. E. 2025. Т. 21, № 3. С. e1011651.

295. Udagawa O. и др. Mitochondrial Fission Factor Drp1 Maintains Oocyte Quality via Dynamic Rearrangement of Multiple Organelles // Curr. Biol. 2014. Т. 24, № 20. С. 2451–2458.

296. Kazerani M. и др. A Novel BIRC6 Variant Impairs Apoptotic Regulation in Familial Premature Ovarian Insufficiency: Functional Validation in a CRISPR/Cas9 Zebrafish Model // Reprod. Sci. 2026. Т. 33, № 6. С. 1170–1188.

297. Jin H.-J. и др. CFAP70 is a solid and valuable target for the genetic diagnosis of oligo-astheno-teratozoospermia in infertile men // eBioMedicine. 2023. Т. 93. С. 104675.

298. Park J. W. и др. Down-Regulation of Neogenin Decreases Proliferation and Differentiation of Spermatogonia during the Early Phase of Spermatogenesis // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23, № 23. С. 14761.

299. Papadopoulou A. A. и др. Signal peptide peptidase-like 2c impairs vesicular transport and cleaves SNARE proteins // EMBO Rep. 2019. Т. 20, № 3. С. EMBR201846451.

300. Niemeyer J. и др. The intramembrane protease SPPL2c promotes male germ cell development by cleaving phospholamban // EMBO Rep. 2019. Т. 20, № 3. С. EMBR201846449.

301. Lee W. S. и др. Syntaxins 6 and 8 facilitate tau into secretory pathways // Biochem. J. 2021. Т. 478, № 7. С. 1471–1484.

302. Zhang Q. и др. Alternative transcription initiation and splicing variants of the *DHRS4* gene cluster // Biosci. Rep. 2009. Т. 29, № 1. С. 47–56.

303. Lai T. и др. SOX5 Controls the Sequential Generation of Distinct Corticofugal Neuron Subtypes // Neuron. 2008. Т. 57, № 2. С. 232–247.

304. Pérez Baca M. D. R. и др. Loss of function of the zinc finger homeobox 4 gene, ZFHX4, underlies a neurodevelopmental disorder // Am. J. Hum. Genet. 2025. Т. 112, № 6. С. 1388–1414.

305. González-Muñoz S. и др. Trans-ethnic GWAS meta-analysis of idiopathic spermatogenic failure highlights the immune-mediated nature of Sertoli cell-only syndrome // Commun. Biol. 2025. Т. 8, № 1. С. 571.

306. Horikoshi M. и др. Elucidating the genetic architecture of reproductive ageing in the Japanese population // Nat. Commun. 2018. Т. 9, № 1. С. 1977.

307. Schwarting G. A. и др. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Regulates the Migration of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons to the Basal Forebrain // J. Neurosci. 2001. Т. 21, № 3. С. 911–919.

308. Connor S. A. и др. Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism-Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2 // Neuron. 2016. Т. 91, № 5. С. 1052–1068.

309. Hasegawa S. и др. Constitutively expressed Protocadherin-α regulates the coalescence and elimination of homotypic olfactory axons through its cytoplasmic region // Front. Mol. Neurosci. 2012. Т. 5.

310. Feng J. и др. Regulation of Neurotransmitter Release by Synapsin III // J. Neurosci. 2002. Т. 22, № 11. С. 4372–4380.

311. Schuermann Y. и др. Activated receptor tyrosine kinases in granulosa cells of ovulating follicles in mice // Mol. Reprod. Dev. 2018. Т. 85, № 4. С. 316–324.

312. Ikegami K. и др. TTLL7 Is a Mammalian β-Tubulin Polyglutamylase Required for Growth of MAP2-positive Neurites // J. Biol. Chem. 2006. Т. 281, № 41. С. 30707–30716.

313. Combinatorial expression of γ-protocadherins regulates synaptic connectivity in the mouse neocortex // eLife. 2024. Т. 12. С. RP89532.

314. Xu G.-F. и др. DNA methylation-mediated expression of zinc finger protein 615 affects embryonic development in *Bombyx mori* // Zool. Res. 2022. Т. 43, № 4. С. 552–565.

315. Nilsson E., Dole G., Skinner M. K. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition // Reproduction. 2009. Т. 138, № 4. С. 697–707.

316. Chaboissier M.-C. и др. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse // Development. 2004. Т. 131, № 9. С. 1891–1901.

317. Mota-Gómez I. и др. Chromatin spatial analysis by METALoci unveils sex-determining 3D regulatory hubs // Nat. Struct. Mol. Biol. 2026. Т. 33, № 4. С. 577–589.

318. Deczkowska A. и др. Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner // Nat. Commun. 2017. Т. 8, № 1. С. 717.

319. Magpali L. и др. Molecular evolution of toothed whale genes reveals adaptations to echolocating in different environments // BMC Genomics. 2024. Т. 25, № 1. С. 1049.

320. Zhang G. и др. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-β, NF-κB and GnRH // Nature. 2013. Т. 497, № 7448. С. 211–216.

321. Izawa M. и др. Expression of the apoptosis-related genes, caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, and apoptotic protease activating factor-1, in human granulosa cells // Fertil. Steril. 1998. Т. 70, № 3. С. 549–552.

322. Matsui T. и др. Expression and activity of Apaf1 and caspase-9 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries // Reproduction. 2003. Т. 126, № 1. С. 113–120.

323. Yoshida H. и др. Apaf1 Is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development // Cell. 1998. Т. 94, № 6. С. 739–750.

324. Qi W. и др. Targeting ATP11B-YAP axis repairs mitochondrial function and inhibits neuronal ferroptosis to attenuate age-related cognitive decline // Signal Transduct. Target. Ther. 2026. Т. 11, № 1. С. 141.

325. To C. и др. Hypoxia-Controlled EphA3 Marks a Human Endometrium-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell that Supports Vascular Growth // PLoS ONE / под ред. Bussolati B. 2014. Т. 9, № 11. С. e112106.

326. O'Donnell L. и др. The MMS22L-TONSL Complex Mediates Recovery from Replication Stress and Homologous Recombination // Mol. Cell. 2010. Т. 40, № 4. С. 619–631.

327. Piwko W. и др. The MMS22L–TONSL heterodimer directly promotes RAD51-dependent recombination upon replication stress // EMBO J. 2016. Т. 35, № 23. С. 2584–2601.

328. Kaneko T. и др. A membrane protein, TMCO5A, has a close relationship with manchette microtubules in rat spermatids during spermiogenesis // Mol. Reprod. Dev. 2019. Т. 86, № 3. С. 330–341.

329. Gardner E. J. и др. Reduced reproductive success is associated with selective constraint on human genes // Nature. 2022. Т. 603, № 7903. С. 858–863.

330. Bøtkjær J. A. и др. Pregnancy-associated plasma protein A in human ovarian follicles and its association with intrafollicular hormone levels // Fertil. Steril. 2015. Т. 104, № 5. С. 1294-1301.e1.

331. Conover C. A., Bale L. K. Loss of pregnancy-associated plasma protein A extends lifespan in mice // Aging Cell. 2007. Т. 6, № 5. С. 727–729.

332. Kawashima I. и др. Targeted Disruption of Nrg1 in Granulosa Cells Alters the Temporal Progression of Oocyte Maturation // Mol. Endocrinol. 2014. Т. 28, № 5. С. 706–721.

333. Kato Y. и др. ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles // EMBO Rep. 2019. Т. 20, № 12. С. EMBR201948251.

334. Liu W. и др. VPS34 Governs Oocyte Developmental Competence by Regulating Mito/Autophagy: A Novel Insight into the Significance of RAB7 Activity and Its Subcellular Location // Adv. Sci. 2024. Т. 11, № 41. С. 2308823.

335. Guastavino J.-M., Boufares S., Crusio W. E. Ovarian Abnormalities in the Staggerer Mutant Mouse // Sci. World J. 2005. Т. 5. С. 661–664.

336. Kim H.-C. и др. Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 Domains (SMIFH2) Reveals the Roles of the Formin Family of Proteins in Spindle Assembly and Asymmetric Division in Mouse Oocytes // PLOS ONE / под ред. Sun Q.-Y. 2015. Т. 10, № 4. С. e0123438.

337. Wang M. и др. A variant in long noncoding RNA NORSF affects granulosa cells response to transcription factor RFX7 // J. Cell. Physiol. 2024. Т. 239, № 11. С. e31414.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Характеристика видов, использованных в межвидовых сравнительно-геномных исследованиях

Таблица А.1 – Виды плацентарных млекопитающих, включенные в анализ длительного сохранения репродуктивной функции

Вид	**Идентификатор в UCSC 470-way, геномная сборка**
Исследуемая группа: длительное сохранение репродуктивной функции или относительно позднее/слабо выраженное возрастное снижение	
Cebus capucinus imitator	cebCap1; GCA_001604975.1
Odocoileus virginianus	HLodoVir3; GCA_014726795.1
Mungos mungo	HLmunMug1; GCA_004023785.1
Crocuta crocuta	HLcroCro1; GCA_008692635.1
Mirounga angustirostris	HLmirAng2; DNA Zoo
Balaenoptera physalus	HLbalPhy1; GCA_008795845.1
Фоновая группа: выраженное возрастное снижение репродуктивной функции	
Macaca mulatta	rheMac10; GCA_003339765.3
Rangifer tarandus	HLranTar1; GCA_004026565.1
Suricata suricatta	HLsurSur1; GCA_006229205.1
Panthera leo	HLpanLeo1; GCA_008795835.1
Halichoerus grypus	HLhalGry1; GCA_012393455.1
Cavia aperea	cavApe1; GCA_000688575.1
Tursiops aduncus	HLturAdu1; GCA_003227395.1
Homo sapiens	hg38; GCA_000001405.15

Таблица А.2 – Виды отряда Хищные, использованные для анализа отложенной имплантации

Вид	**Идентификатор в UCSC 470-way, геномная сборка**
Исследуемая группа: Куньи с отложенной имплантацией	
Martes zibellina	HLmarZib1; GCA_012583365.1
Lontra canadensis	HLlonCan1; GCA_010015895.1
Enhydra lutris kenyoni	enhLutKen1; GCF_002288905.1
Mustela erminea	HLmusErm1; GCA_009829155.1
Neovison vison	HLneoVis1; GCA_900108605.1
Фоновая группа: Хищные без отложенной имплантации	
Pteronura brasiliensis	HLpteBra2; DNA Zoo
Lutra lutra	HLlutLut1; GCA_902655055.1
Mustela putorius	HLmusPut1; GCA_902460205.1
Mustela putorius furo	HLmusFur2; GCA_011764305.1
Puma concolor	HLpumCon1; GCA_003327715.1
Panthera tigris altaica	panTig1; GCF_000464555.1
Neofelis nebulosa	HLneoNeb1; DNA Zoo
Panthera pardus	HLpanPar1; GCA_001857705.1
Acinonyx jubatus	HLaciJub2; GCF_003709585.1
Neomonachus schauinslandi	neoSch1; GCF_002201575.1
Panthera onca	HLpanOnc2; GCA_028533385.1
Prionailurus bengalensis euptilurus	HLpriBen1; GCA_005406085.1
Lynx pardinus	HLlynPar1; GCA_900661375.1

Продолжение таблицы А.2

Lynx canadensis	HLlynCan1; GCF_007474595.1
Panthera leo	HLpanLeo1; GCA_008795835.1
Odobenus rosmarus divergens	odoRosDiv1; GCF_000321225.1
Felis catus	felCat9; GCF_000181335.3
Puma yagouaroundi	HLpumYag1; GCA_014898765.1
Felis nigripes	HLfelNig1; GCA_004023925.1
Cryptoprocta ferox	HLcryFer2; GCA_028646485.1
Vulpes vulpes	HLvulVul1; GCA_003160815.1
Vulpes lagopus	HLvulLag1; GCA_004023825.1
Canis lupus dingo	HLcanLupDin1; GCF_003254725.1
Canis lupus familiaris	canFam5; GCF_005444595.1
Potos flavus	HLpotFla1; GCA_028534135.1
Lycaon pictus	HLlycPic2; GCA_004216515.1
Ailurus fulgens	HLailFul2; GCA_002007465.1
Crocuta crocuta	HLcroCro1; GCA_008692635.1
Hyaena hyaena	HLhyaHya1; GCA_003009895.1
Paradoxurus hermaphroditus	HLparHer1; GCA_004024585.1
Nasua narica	HLnasNar1; GCA_028533885.1
Procyon lotor	HLproLot1; GCA_028646535.1
Bassariscus sumichrasti	HLbasSum1; DNA Zoo
Suricata suricatta	HLsurSur1; GCA_006229205.1
Mungos mungo	HLmunMug1; GCA_004023785.1
Helogale parvula	HLhelPar1; GCA_004023845.1

Таблица А.3 – Виды зубатых китов, использованные для анализа продолжительного пострепродуктивного периода

Вид	**Идентификатор в UCSC 470-way, геномная сборка**
Исследуемая группа: документированы менопауза и продолжительный пострепродуктивный период	
Orcinus orca	orcOrc1; GCA_000331955.2
Monodon monoceros	HLmonMon1; GCA_005190385.2
Delphinapterus leucas	HLdelLeu2; GCA_002288925.3
Фоновая группа: менопауза и продолжительный пострепродуктивный период не установлены	
Globicephala melas	HLgloMel1; GCA_006547405.1
Peponocephala electra	HLpepEle1; DNA Zoo
Lagenorhynchus obliquidens	HLlagObl1; GCA_003676395.1
Tursiops aduncus	HLturAdu1; GCA_003227395.1
Phocoena phocoena	HLphoPho1; GCA_004363495.1
Kogia breviceps	HLkogBre1; GCA_004363705.1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Филогенетические взаимоотношения видов, включенных в анализ отложенной имплантации

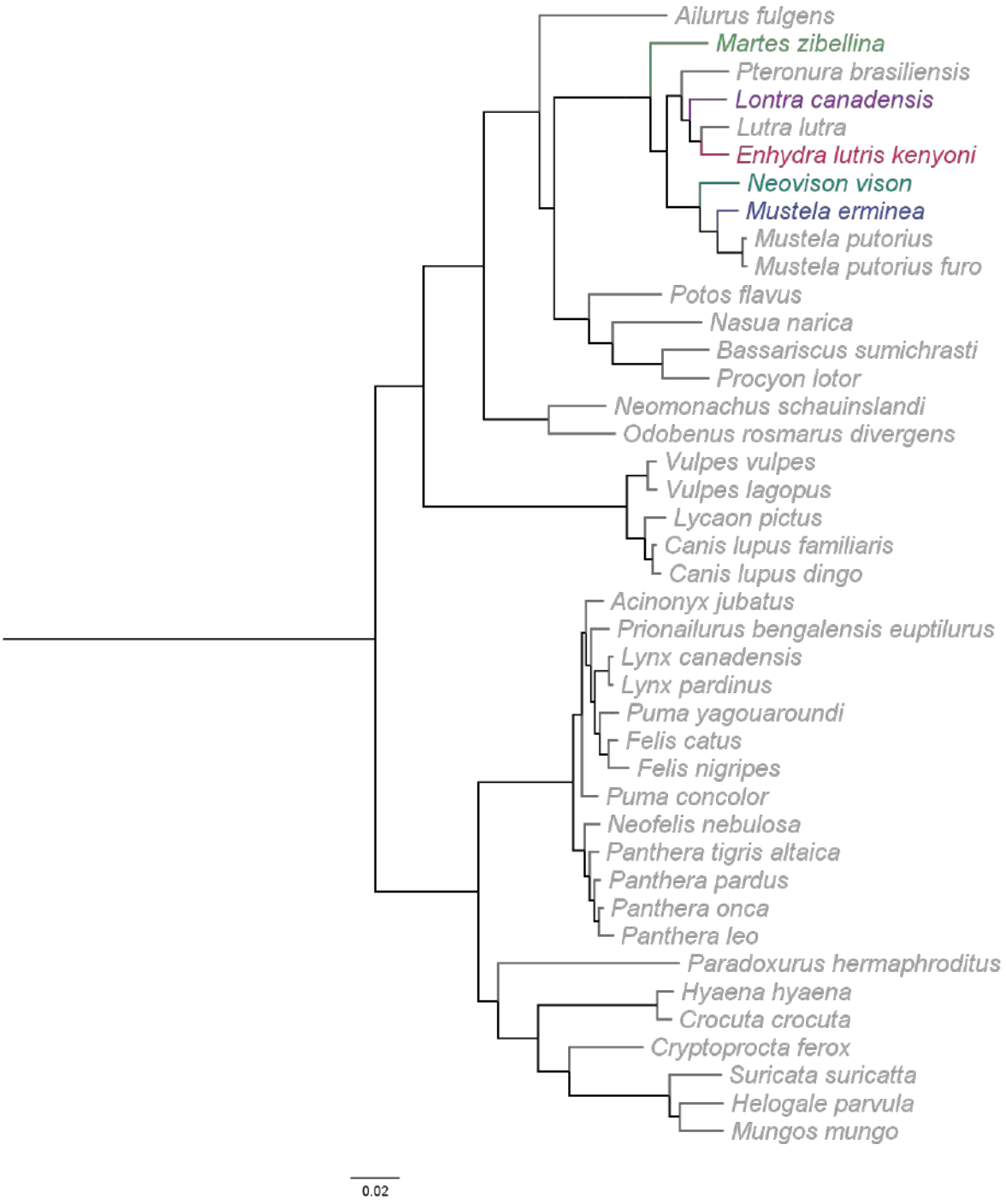


Рисунок Б.1 – Филогенетическое дерево исследованных видов отряда Хищные. Яркими цветами выделены виды исследуемой группы с отложенной имплантацией, серым – виды фоновой группы без отложенной имплантации

ПРИЛОЖЕНИЕ В
Дополнительные результаты анализа эволюционно ускоренных геномных регионов у плацентарных млекопитающих с длительным сохранением репродуктивной функции

Таблица В.1 – Число ЭУР и показатель непрерывности геномных сборок у видов с длительным сохранением репродуктивной функции

Вид	**Сборка UCSC 470-way**	**Число ЭУР**	**N50 скаффолдов, п. н.**
Cebus capucinus imitator	cebCap1	10 096	5 274 112
Odocoileus virginianus	HLodoVir3	7 750	17 102 683
Mungos mungo	HLmunMug1	8 961	236 501
Crocuta crocuta	HLcroCro1	13 354	7 236 831
Mirounga angustirostris	HLmirAng2	8 904	139 676 048
Balaenoptera physalus	HLbalPhy1	8 649	871 016

Таблица В.2 – Общие ЭУР, перекрывающиеся с cCRE с кандидатными цис-регуляторными элементами генома человека

Координаты ЭУР (hg38)	**Виды с ЭУР**	**ENCODE cCRE ID**	**Класс cCRE**	**Ближайший ген (тип гена; расстояние до TSS, п. н.)**
chr1:89060248-89060298	гиена пятнистая, мангуст полосатый, олень белохвостый	EH38E2823455	CA-H3K4me3	*GBP1* (белок-кодирующий; 4 841)
chr1:220977224-220977274	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, морской слон северный	EH38E3993236	TF	*HLX-AS1* (длинная некодирующая РНК; 97 101)
chr1:247723659-247723709	панамский белолицый капуцин, морской слон северный, олень белохвостый	EH38E3999101	pELS	*ENSG00000239395* (белок-кодирующий; 0)
chr10:52411034-52411084	панамский белолицый капуцин, морской слон северный, финвал	EH38E2900964	PLS	*THAP12P3* (процессированный псевдоген; 0)

Продолжение таблицы В.2

chr10:55600539-55600589	панамский белолицый капуцин, морской слон северный, финвал	EH38E4009688	CA	*MTRNR2L5* (белок-кодирующий; 1387)
chr11:5058830-5058880	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E2941833	CA-CTCF	*OR52E2* (белок-кодирующий; 594)
chr11:5058880-5058930	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E2941833	CA-CTCF	*OR52E2* (белок-кодирующий; 594)
chr11:58344304-58344354	панамский белолицый капуцин, мангуст полосатый, олень белохвостый	EH38E2959052	CA-H3K4me3	*OR5B19P* (непроцессированный псевдоген; 229)
chr11:62521328-62521378	гиена пятнистая, мангуст полосатый, олень белохвостый	EH38E2961524	dELS	*AHNAK* (белок-кодирующий; 14530)
chr11:62526674-62526724	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E2961536	dELS	*AHNAK* (белок-кодирующий; 289)
chr11:78292390-78292440	мангуст полосатый, олень белохвостый, финвал	EH38E2974858	dELS	*ENSG00000288853* (длинная некодирующая РНК; 22267)
chr12:63823100-63823150	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, мангуст полосатый	EH38E3023620	pELS	*RXYLT1-AS1* (длинная некодирующая РНК; 828)

Продолжение таблицы В.2

chr13:25096548-25096598	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, мангуст полосатый	EH38E1661158	CA-H3K4me3	*ENSG00000289006* (длинная некодирующая РНК; 402)
chr14:106359945-106359995	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, финвал	EH38E3122339	pELS	*IGHV3-33* (ген вариабельного сегмента иммуноглобулина; 333)
chr16:3317375-3317425	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E3164261	CA-H3K4me3	*ZNF75A* (белок-кодирующий; 5630)
chr16:3317575-3317625	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E3164261	CA-H3K4me3	*ZNF75A* (белок-кодирующий; 5630)
chr16:3317809-3317859	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E4134097	TF	*ENSG00000262316* (процессированный псевдоген; 5755)
chr16:20117214-20117264	гиена пятнистая, морской слон северный, олень белохвостый	EH38E4138587	CA	*ENSG00000277211* (процессированный псевдоген; 38407)
chr16:87696846-87696896	гиена пятнистая, мангуст полосатый, финвал	EH38E3198359	pELS	*ENSG00000226180* (длинная некодирующая РНК; 628)
chr19:34944337-34944387	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, морской слон северный	EH38E1950493	dELS	*ENSG00000280106* (транскрипт, требующий экспериментального подтверждения; 6 647)

Продолжение таблицы В.2

chr19:34944437-34944487	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, морской слон северный	EH38E1950493	dELS	*ENSG00000280106* (транскрипт, требующий экспериментального подтверждения; 6 647)
chr19:34944487-34944537	панамский белолицый капуцин, гиена пятнистая, морской слон северный	EH38E1950493	dELS	*ENSG00000280106* (транскрипт, требующий экспериментального подтверждения; 6 647)
chr19:36877065-36877115	морской слон северный, олень белохвостый, финвал	EH38E3303547	CA-H3K4me3	*Y_RNA* (прочая РНК; 18632)
chr19:36877901-36877951	морской слон северный, олень белохвостый, финвал	EH38E3303549	CA-H3K4me3	*Y_RNA* (прочая РНК; 19232)
chr19:5422209-54222140	гиена пятнистая, морской слон северный, олень белохвостый	EH38E3316576	pELS	*LILRB3* (белок-кодирующий; 603)
chr3:24521875-24521925	гиена пятнистая, мангуст полосатый, олень белохвостый	EH38E3501640	pELS	*ENSG00000265028* (микроРНК; 243)
chr3:38723770-38723820	гиена пятнистая, морской слон северный, мангуст полосатый	EH38E2193431	dELS	*SCN10A* (белок-кодирующий; 70030)
chr3:86012514-86012564	морской слон северный, мангуст полосатый, финвал	EH38E3525649	PLS	*THAP12P2* (процессированный псевдоген; 0)

Продолжение таблицы В.2

chr3:122577107-122577157	гиена пятнистая, мангуст полосатый, финвал	EH38E4309231	pELS	*PARP15* (белок-кодирующий; 337)
chr5:140857485-140857535	гиена пятнистая, морской слон северный, мангуст полосатый	EH38E3665752	pELS	*PCDHA10* (белок-кодирующий; 1391)
chr6:30006851-30006901	гиена пятнистая, морской слон северный, олень белохвостый	EH38E3699500	pELS	*HLA-J* (транскрибируемый непроцессированный псевдоген; 75)
chr7:6691178-6691228	морской слон северный, мангуст полосатый, олень белохвостый	EH38E3756983	dELS	*ZNF12* (белок-кодирующий; 9547)

Примечание – PLS (promoter-like signature) – промотороподобный элемент; pELS (proximal enhancer-like signature) – проксимальный энхансероподобный элемент; dELS (distal enhancer-like signature) – дистальный энхансероподобный элемент; CA (chromatin accessibility) – участок доступного хроматина; CA-CTCF (chromatin accessibility with CTCF) – участок доступного хроматина, связанный с фактором CTCF.

Таблица В.3 – Гены, связанные с эволюционно ускоренными регионами у исследованных видов плацентарных млекопитающих

Гены, непосредственно содержащие общие эволюционно ускоренные регионы (n = 63):	*ADGRE2*, *AHNAK*, *ATRNL1*, *C10orf90*, *CADM2*, *DNAAF9*, *DYNC2H1*, *ELP4*, *EPPK1*, *GAB2*, *GBP1*, *JPH3*, *KLHDC4*, *KRT6A*, *KRT6C*, *LILRB3*, *LILRB5*, *OR14A2*, *OR4A15*, *OR4D2*, *OR52E2*, *OR52N1*, *OR8J2*, *OR9G4*, *PABPC3*, *PCDH15*, *PCDHA1*, *PCDHA10*, *PCDHA2*, *PCDHA3*, *PCDHA4*, *PCDHA5*, *PCDHA6*, *PCDHA7*, *PCDHA8*, *PCDHA9*, *PRH1*, *PRSS23*, *RAB3GAP2*, *RAE1*, *RDX*, *RPS9*, *RPTN*, *SAMD9*, *SCN10A*, *SERGEF*, *SIGLEC7*, *SLC22A25*, *SPATA31F1*, *TAS2R10*, *TRIM5*, *TRMT13*, *TTN*, *XNDC1N*, *XNDC1N-ZNF705EP-ALG1L9P*, *ZBTB20*, *ZC3H12C*, *ZNF12*, *ZNF30*, *ZNF345*, *ZNF416*, *ZNF419*, *ZNF75A*.

Продолжение таблицы В.3

Гены, в пределах которых выявлены ЭУР у всех шести исследуемых видов (n = 149):	*ACBD6, ADGRL2, AFG2A, AGAP1, AGBL1, AHNAK, ALK, ANAPC10, AOPEP, ARID1B, ARMH3, ASIC2, ASTN2, ATRNL1, AUTS2, BACH2, BAZ2B, BBS9, BCAS3, CADM1, CADM2, CAMKMT, CAMTA1, CCDC171, CDIN1, CNTN5, CREB5, CTNNA2, CTNNA3, CWC27, DAB1, DENND1A, DLG2, DNM3, DPYD, EBF3, EFNA5, EPPK1, ERBB4, ERC2, ERI3, EXOC6B, FHOD3, FOXP1, FRMD5, GAREM1, GPC6, GRIP1, GSTCD, HDAC9, HELZ, HPSE2, INTS12, ITPR2, JAK2, KAT6B, KCNH1, KIAA0319, KIAA1217, KIAA2012, LINGO2, LRMDA, LSAMP, MAGI2, MAML2, MAPKAP1, MAST4, MEGF11, MEIS2, MGST1, MIGA1, MRTFB, MSRA, MYO3B, NAALADL2, NCOA1, NCOA2, NDUFAF6, NF1, NFE2L2, NFIA, NRG1, NRXN1, NRXN3, NTM, PALM2AKAP2, PATJ, PBX3, PCCA, PCDH15, PCDH9, PCDHGA1, PCDHGA2, PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PEAK1, PEX14, PHF21A, PLCB1, PLXDC2, PTPRD, PTPRK, RAB11A, RABGAP1L, RAD51B, RALYL, RANBP17, RARB, RASGEF1B, RBFOX1, RIMS2, RNF220, ROBO1, RORA, SCUBE2, SLC35F1, SMYD3, SOX5, SOX6, SRGAP2, ST6GALNAC3, STK3, SUMF1, TBC1D5, TENM2, THAP12, THSD7B, TTN, UACA, USH2A, USP32, VCL, VMP1, WWOX, ZBTB20, ZFHX3, ZFPM2, ZNF345, ZNF407, ZNRF2*
Гены, ассоциированные с общими ЭУР по регуляторным доменам (n = 250):	*ADAM12, ADAM18, ADAM32, ADAMTSL1, ADGRE2, ADRA2C, AHNAK, ALDH3A2, ALG1L2, ALX4, AMER2, ANGPT1, ANKRD36B, ATF6B, ATRNL1, BBX, BUB1B, C10orf120, C10orf90, C1orf61, C20orf194, CADM2, CAVIN4, CBWD6, CCL21, CCND1, CD33, CD82, CDK6, CEP44, CLEC6A, CLPB, CNTN3, CNTNAP3, CNTNAP3B, COL18A1, COL24A1, CRTAP, DDI1, DEFB131B, DIRAS2, DKK1, DMBT1, DMRTA2, DUSP10, DYNC2H1, ELP4, ENSG00000182974, ENSG00000254469, ENSG00000284438, EPPK1, FADS2, FADS3, FAF1, FAHD2B, FAM126B, FAM205A, FAM90A1, FBL, FMO3, FOLH1, FRG2C, FUT10, FZD4, GAB2, GAP43, GBP1, GBP3, GJA1, GLRX3, GP2, GPR139, GPR39, GSTA3, GSTA5, HAND2, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-G, HLX, IARS2, IGFBPL1, IGSF11, IPMK, IPO8, JPH3, KCNC1, KISS1R, KLHDC4, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT76, KRT77, LARP4, LILRA6, LILRB2, LILRB3, LILRB5, LIMA1, LRRC39, MAVS, MBL2, MEGF11, MEIG1, MTRNR2L13, MTRNR2L3, MTRNR2L5, MZT2A, NBPF4, NBPF6, NEUROD4, NIPSNAP3A, NMD3, NOG, NOL6, NPIPA7, NRBP2, NRG1, OLAH, OR10R2, OR10W1, OR13D1, OR14A2, OR14J1, OR1A1, OR2A12, OR2A25, OR2AK2, OR2C1, OR2J2, OR2L5, OR3A2, OR4A15, OR4A5, OR4C13, OR4C46, OR4D2, OR52E2, OR52N1, OR52N5, OR5B17, OR5J2, OR5T2, OR6C1, OR7A17, OR7C2, OR7D2, OR7D4, OR7E24, OR8B2, OR8D1, OR9G4, OR9K2, ORC2, OTOP1, PABPC3, PAK6, PARP15, PAX6, PCDHA10, PCDHA11, PCTP, PEBP1, PGM2, PHOX2A, PLEKHA3, PLGLB1, PLGLB2, POFUT2, PRRX1, PRSS23, PRSS3, PSMC4, R3HDM4, RAB11A, RAB3GAP2, RAE1, RARB, RDX, RHBG, ROR1, RPTN, RSPO2, SAMD9, SCGB1A1, SCN10A, SCN5A, SERGEF, SFPQ, SIGLEC7, SLC22A24, SLC22A25, SLC47A1, SLC4A11, SPATA31A1, SPTSSB, SRGAP1, SUSD5, SYK, TAOK3, TAS2R10, TBC1D1, TBC1D32, TBC1D3K, TBC1D3L, TCHH, THRB, TIGD7, TMEFF1, TMEM121, TMEM5, TMTC1, TNFRSF11A, TNXB, TPCN2, TRAM1L1, TRH, TRIM21, TRMT13, TTN, USP35, VGLL3, VPREB1, XYLT1, ZBTB20, ZC3H12C, ZCCHC2, ZMYM1, ZNF107, ZNF12, ZNF134, ZNF211, ZNF280B, ZNF30, ZNF316, ZNF333, ZNF345, ZNF416, ZNF419, ZNF550,*

Продолжение таблицы В.3

	ZNF577, ZNF680, ZNF699, ZNF773, ZNF792, ZNF829, ZNHIT6, ZNRD1, ZWINT

Таблица В.4 – Функциональные категории GO, связанные с репродуктивными и эндокринными процессами, среди генов, в регуляторных доменах которых ЭУР присутствовали у всех шести видов

Функциональная категория*	**GO ID**	**Число генов**	**FDR**	**Гены**
reproductive system development	GO:0061458	27	0,0025	*ACVR2A, ADAM18, ADAM32, ARID5B, BCL2, BMPR1B, BRIP1, CITED2, CTNNB1, CYP7B1, DNAJC19, FER, FST, GFRA1, GREB1L, ID4, INHBA, KIF18A, LRP2, NOG, NR2F2, SALL1, SOX9, TGFB2, WDR19, WNT5A, ZFPM2*
gonad development	GO:0008406	21	0,0057	*ACVR2A, ADAM18, ADAM32, ARID5B, BCL2, BMPR1B, BRIP1, CITED2, FER, FST, GFRA1, INHBA, KIF18A, LRP2, NR2F2, SALL1, SOX9, TGFB2, WDR19, WNT5A, ZFPM2*
sex differentiation	GO:0007548	27	0,0011	*ACVR2A, ADAM18, ADAM32, ARID5B, BCL2, BMPR1B, BRIP1, CITED2, CTNNB1, DACH1, DMRTA2, DNAJC19, FER, FST, GFRA1, GREB1L, INHBA, KIF18A, LRP2, NR2F2, PBX1, SALL1, SOX9, TGFB2, WDR19, WNT5A, ZFPM2*
positive regulation of reproductive process	GO:2000243	10	0,0203	*CITED2, CTNNB1, INHBA, PDE3A, PLCB1, PRDM14, SMURF2, SOX9, WNT5A, ZFPM2*
endocrine system development	GO:0035270	20	$2{,}30 \times 10^{-5}$	*ARID5B, BRAF, CDH2, CITED2, CREB1, EDNRA, NOG, ONECUT1, PAX6, PBX1, PITX1, PITX2, POU3F2, SALL1, SIX3, SOX2, SOX4, SOX9, WNT11, WNT5A*
response to hormone	GO:0009725	68	$3{,}47 \times 10^{-5}$	*ALK, BCAR3, BCAS3, BCL2, CAB39, CCND1, CITED2, CREB1, CTBP2, CYP26B1, CYP7B1, EDNRA, EFNA5, EPHA3, EPHA4, EPHA7, ERBB4, ESRRG, FER, FOXP1, GHR, GNAI1, GRB14, HDAC9, IGF1R, IGFBP7, INHBA, JAK2, JUN, KLF9, LMO3, LRP2, MAPKAP1, MC4R, MEF2C, NCOA1, NCOA2, NEDD4, NFKB1, NR1D2, NR2E3, NR4A2, NR4A3, NTRK2, OPRK1, OTOP1, PDE3A, PID1, PIK3R1, PLCB1, PLPP1,*

Продолжение таблицы В.4

				PNPT1, PRKD1, PRL, RARB, REG3G, SCGB1A1, SIK2, SMYD3, SORL1, TBX2, TCF12, TGFB2, THBS1, THRB, TRIM24, VPS13C, ZFP36L1
response to steroid hormone	GO:0048545	24	0,0224	*BCL2, CYP7B1, ESRRG, FOXP1, GHR, IGFBP7, INHBA, JAK2, JUN, KLF9, LMO3, NCOA1, NCOA2, NEDD4, NR2E3, NR4A3, PDE3A, PLPP1, SCGB1A1, SMYD3, TBX2, TGFB2, THBS1, ZFP36L1*
hormone-mediated signaling pathway	GO:0009755	19	0,0244	*CTBP2, CYP26B1, CYP7B1, ESRRG, FOXP1, GHR, JAK2, LMO3, NCOA1, NEDD4, NR1D2, NR2E3, NR4A3, PDE3A, PLPP1, PRL, RARB, THRB, TRIM24*
cellular response to follicle-stimulating hormone stimulus	GO:0071372	3	0,0451	*EDNRA, EFNA5, INHBA*

*Для представления результатов были отобраны категории биологических процессов (BP) генов онтологии (GO) с FDR < 0,05, непосредственно относящиеся к репродуктивной и эндокринной функции.

Таблица В.5 – Гены с повышенной экспрессией в нескольких тканях по результатам анализа TissueEnrich

Ткани с повышенной экспрессией	**Число генов**	**Гены**
Кора головного мозга и яичник	5	*AJAP1, CAMK1G, NAV3, NXPH2, SLC4A3*
Кора головного мозга и эндометрий	2	*ASIC2, PRLHR*
Яичник и эндометрий	2	*BNC2, HTR1E*
Кора головного мозга и щитовидная железа	7	*CNTN5, DGKI, KCTD8, LRRN3, NTRK2, SLC39A10, SLITRK5*

Таблица В.6 – Эволюционно ускоренные регионы в регуляторных доменах генов *SLC4A3* и *HTR1E* и их перекрытие с кандидатными цис-регуляторными элементами ENCODE

Ген	**Всего ЭУР**	**ЭУР, перекрывающихся с cCRE**	**Число видов с перекрытиями**	**Число различных cCRE**	**Классы cCRE**
SLC4A3	31	13	6	15	CA, CA-CTCF, dELS
HTR1E	21	8	6	8	CA, CA-H3K4me3, dELS, pELS

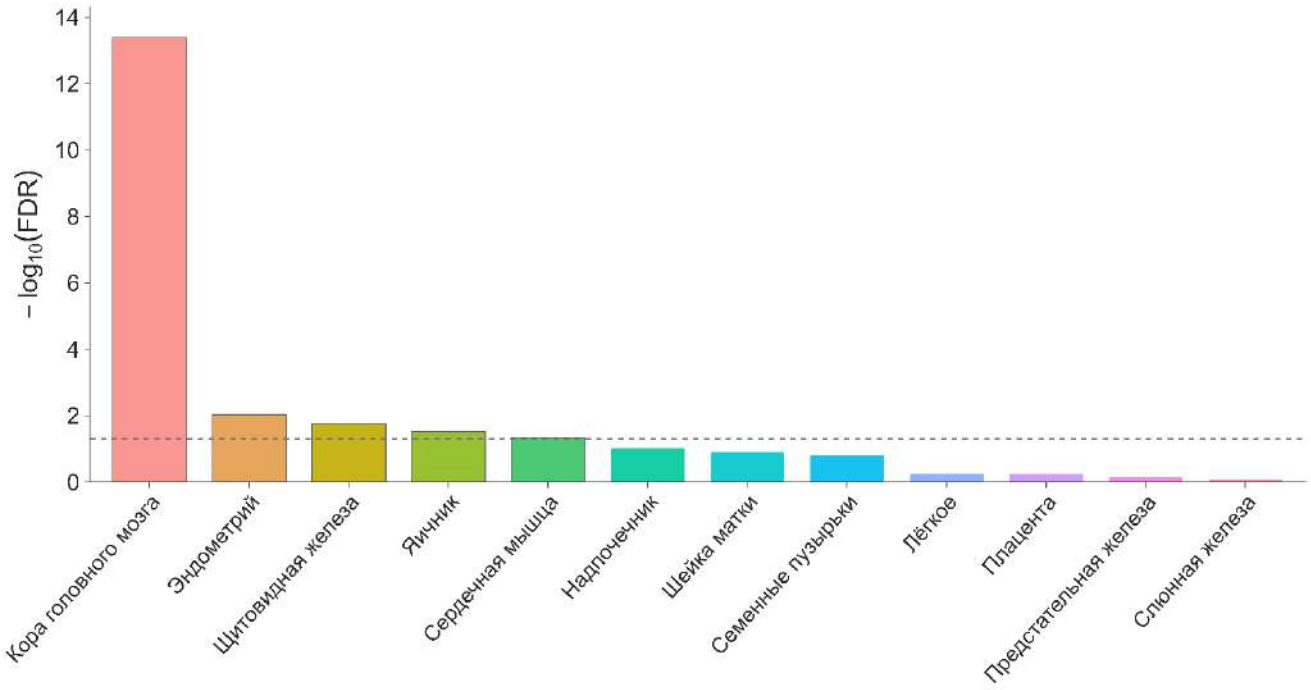


Рисунок В.1 – Результаты анализа тканевой специфичности экспрессии 960 генов, в регуляторных доменах которых ЭУР выявлены у всех шести исследуемых видов плацентарных млекопитающих. Анализ проведен с использованием TissueEnrich на основе данных Human Protein Atlas с пользовательским фоновым набором генов, сформированным на основе консервативных геномных регионов, проверявшихся на ускоренную эволюцию. По оси рдинатприведены значения $-\log_{10}(\mathrm{FDR})$

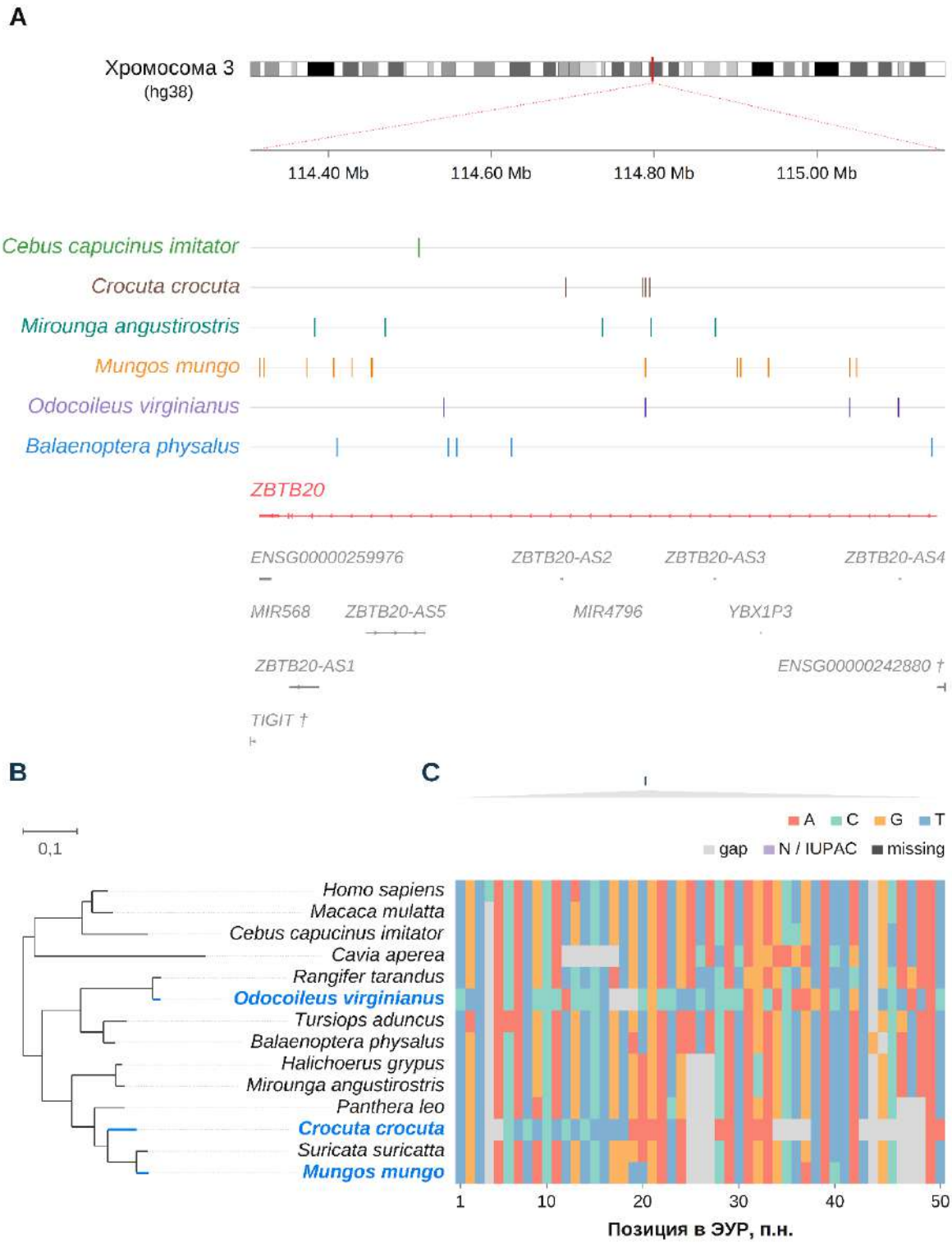


Рисунок В.2 – Распределение эволюционно ускоренных регионов в области гена ZBTB20 и множественное выравнивание одного из них. А – расположение ЭУР, выявленных у шести исследуемых видов плацентарных млекопитающих, в области гена *ZBTB20*. Координаты приведены относительно референсного генома человека GRCh38 (hg38). В – филогенетическое дерево 14 видов млекопитающих. Синим цветом выделены эволюционные линии трех видов, у которых выявлено ускорение в выбранном ЭУР. С – множественное выравнивание последовательностей выбранного ЭУР длиной 50 п. н. Вертикальные штрихи на панели А обозначают положения ЭУР, их ширина условная. На панели С цветами обозначены нуклеотиды A, C, G и T, серым цветом – разрывы выравнивания

ПРИЛОЖЕНИЕ Г
Дополнительные материалы полногеномного исследования соболей с репродуктивным долголетием

Таблица Г.1 – Индивидуальные характеристики исследованных соболей

Коллекционный номер	**Пол**	**Группа**	**Происхождение**	**Окраска меха**	**Средняя глубина покрытия, ×**
13	самка	Дикие	Сихотэ-Алинь	–	5,66
16	самка	Дикие	Сихотэ-Алинь	–	8,64
19	самка	Дикие	Сихотэ-Алинь	–	7,97
2107	самец	Дикие	Камчатка, Тигильский р-н	–	8,76
2108	самец	Дикие	Камчатка, Тигильский р-н	–	5,60
2110	самка	Дикие	Камчатка, Тигильский р-н	–	5,83
2250	самка	Дикие	Омская обл., Тевризский р-н	–	10,45
2253	самка	Дикие	Омская обл., Тевризский р-н	–	10,32
2254	самка	Дикие	Омская обл., Тевризский р-н	–	7,12
2311	самец	Дикие	пос. Тура, Красноярский край	–	90,58
2502	самка	Дикие	о. Сахалин, Невельский р-н	–	5,17
2506	самец	Дикие	о. Сахалин, Невельский р-н	–	11,02
2507	самец	Дикие	о. Сахалин, Невельский р-н	–	4,82
3333	самец	Дикие	о. Итуруп	–	5,45
3334	самка	Дикие	о. Итуруп	–	5,94
3335	самец	Дикие	о. Итуруп	–	22,61
3465	самец	Дикие	Республика Алтай, Улаганский р-н	–	12,09
3466	самка	Дикие	Республика Алтай, Улаганский р-н	–	5,73
3470	самка	Дикие	Республика Алтай, Улаганский р-н	–	5,97
7612	самка	Дикие	пос. Келлог, Красноярский край	–	7,06
7613	самка	Дикие	пос. Келлог, Красноярский край	–	7,99
7614	самец	Дикие	пос. Келлог, Красноярский край	–	5,87
7626	самец	Дикие	р. Подкаменная Тунгуска	–	7,00
7633	самка	Дикие	р. Подкаменная Тунгуска	–	5,63
7666	самка	Дикие	р. Подкаменная Тунгуска	–	3,57
7689	самец	Дикие	пос. Агириш, восточный Урал	–	30,93
7692	самец	Дикие	пос. Агириш, восточный Урал	–	16,20
7693	самец	Дикие	пос. Агириш, восточный Урал	–	18,37
8301	самец	Дикие	Республика Бурятия, Окинский р-н	–	14,83
8307	самка	Дикие	Республика Бурятия, Окинский р-н	–	5,88
8309	самец	Дикие	Республика Бурятия, Окинский р-н	–	7,64
GKM	самка	Дикие	не указано	–	70,79
8007	самец	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	–	8,42

Продолжение таблицы Г.1

8012	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	26,91
8049	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	9,15
8056	самец	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	–	6,50
8066	самец	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	–	5,97
8070	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	10,33
8078	самец	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	–	6,29
8080	самец	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	–	14,51
8081	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	11,07
8146	самец	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	–	18,73
8151	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	13,99
9705	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	альбинос	6,95
9706	самка	Фермерские	зверохозяйство «Русский соболь»	альбинос	15,09
8205	самка	Исследуемая группа	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	36,34
8217	самка	Исследуемая группа	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	15,72
8218	самка	Исследуемая группа	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	27,55
9314	самка	Исследуемая группа	племенной зверосовхоз «Салтыковский»	темно-коричневая	16,30
9318	самка	Исследуемая группа	племенной зверосовхоз «Салтыковский»	темно-коричневая	13,52
9336	самка	Исследуемая группа	племенной зверосовхоз «Салтыковский»	темно-коричневая	31,22
9337	самка	Исследуемая группа	племенной зверосовхоз «Салтыковский»	темно-коричневая	20,03
9415	самка	Исследуемая группа	зверохозяйство «Русский соболь»	черная	30,39



Рисунок Г.1 – Географическое происхождение исследованных соболей

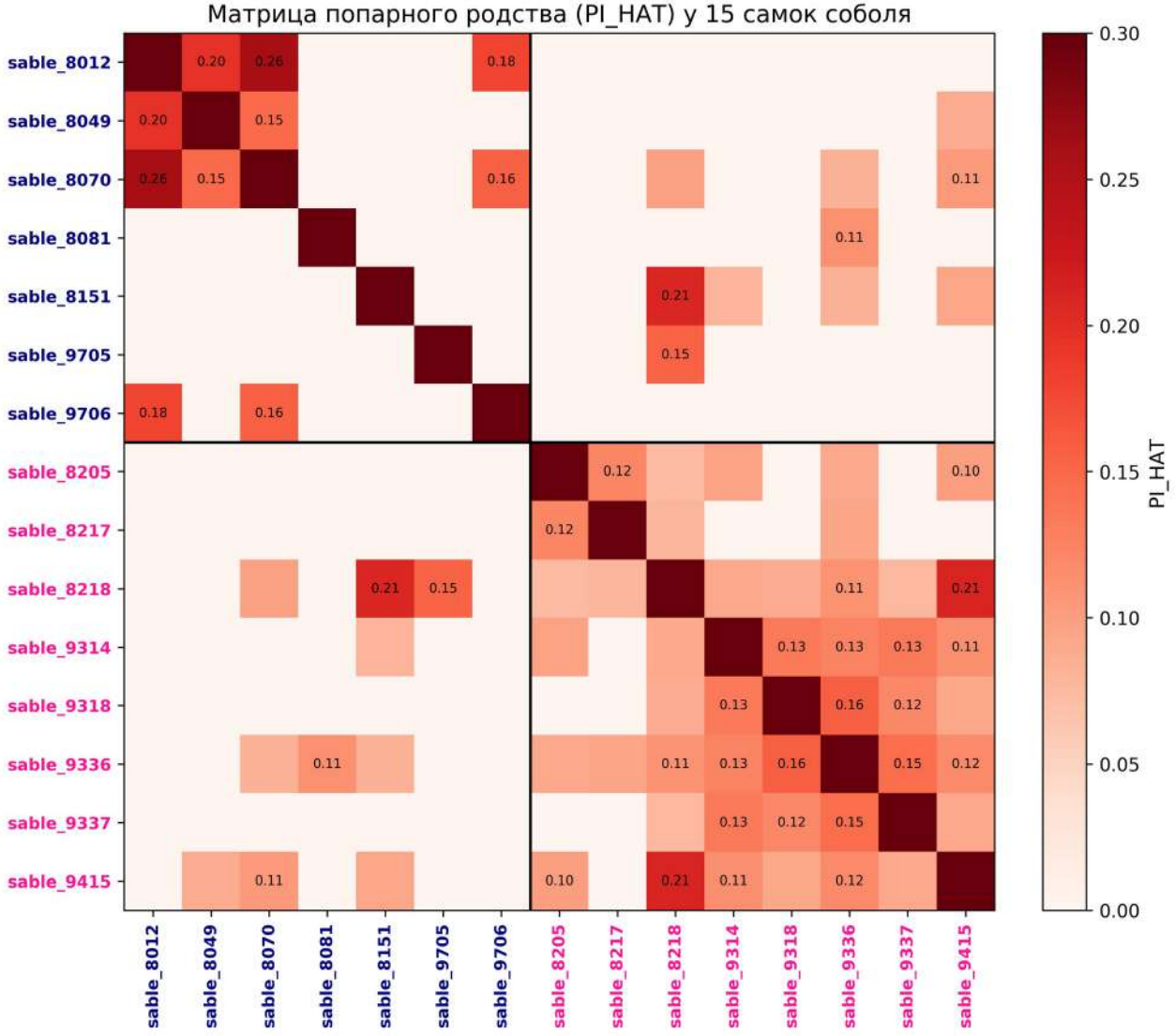


Рисунок Г.2 – Матрица значений PI_HAT при анализе попарного родства 15 фермерских самок соболя

Таблица Г.2 – Гены, расположенные в пределах кандидатных геномных регионов, выявленных при сравнении самок соболя с репродуктивным долголетием и контрольных животных

Гены, выявленные при сравнении долгоживущих и фермерских самок (n = 419)	*AADACL2, ABCA12, ACOD1, ACTR3, ADAM9, ADM2, ADSS2, AGBL3, ALX1, ANKRD55, ANKUB1, ANXA10, APAF1, APEX1, ARL8B, ARSB, ASB18, ATG5, ATP11B, ATP2C1, B3GALT1, B3GLCT, B4GALT6, BCKDHB, BCL7C, BOLL, C15orf61, C2orf66, C3orf33, C3orf56, C6orf163, CACNA1C, CADPS, CALD1, CAPN3, CAPRIN2, CATSPERE, CCDC189, CCK, CD2BP2, CDIN1, CEP192, CEP57L1, CHCHD4, CHRNA1, CHRNA7, CLDN16, CLDN2, CLN5, CLSTN2, CNBD1, CNOT6L, COG5, COG7, COL6A3, COL6A6, COMMD2, COQ7, COMMD6, COX6C, CPQ, CRELD1, CRTAP, CRYBG1, CSNKA2IP, CTF1, CTSG, CX3CR1, CXCR4, CYB5R4, DACH1, DCAF1, DCTN5, DDX60, DDX60L, DENND5B, DGKD, DGKG, DHFR, DIPK1A, DLG1, DMRTA1, DSG4, DTX3L, DYNC1I2, EBF2, EDDM3A, EDDM3B, EDEM1, EDNRB, EEF2K, EIF4G3, ELOVL2, EMC3, EN1, ENOX1, EPHA3, EPS15, ERC2, ERN2, ESCO1, ESD, EXOC4, FABP4, FABP9, FAIM2, FAM110B, FAM133A, FAM13A, FAM20C, FAM234B, FANCD2, FAT3, FBXL19, FBXL3, FGF23, FMNL2, FOXL3, FOXN3, FRMPD3, FUS, GABRG3, GANC, GBX2, GFM1, GJB7, GMNC, GMPS, GPRASP1, GPRASP2, GREB1L, GRIP2, GSG1, GTF3A, GULP1, GZMB, GZMH, HAT1, HBS1L, HDAC10, HDAC4, HERC3, HS3ST4, HSD17B13, IDO2, IFI30, IGF2BP2, IGSF6, IL17RC, IL20RB, IMP3, IMPA1, IMPG1, INTS1, IQSEC1, IRAK1BP1, ITGA8, ITGAL, ITGB5, KALRN, KAT8, KCMF1, KCNA5, KCNH8, KCNMB2, KCNMB3, KCTD12, KIAA1210, KLHDC7B, KLHL32, LAMA4, LHFPL3, LINGO1, LIPH, LMF2, LMO7, LRRC63, LRRC8B, LXN, MACROD2, MAD1L1, MAGEL2, MAMDC2, MAP2K5, MAP3K13, MARCHF11, MARCO, MARS2, MAST3, MB21D2, MECOM, METTL25, METTL9, MGAT5, MIOX, MMS22L, MOSMO, MRM2, MRPL3, MSH3, MSL2, MSN, MTIF3, MTX2, MYCBP2, MYLK, MYLPF, MYO3B, MYO6, NAA15, NAALADL2, NAP1L2, NAV3, NBEA, NCAPH2, NDN, NDUFAB1, NDUFC1, NEK10, NELL2, NKIRAS1, NLGN1, NMD3, NME7, NME8, NR1D2, NR2C2, NUDT1, OCLN, ODF3B, OR10P1, OR2AP1, OR2T27, OR2T6, OR6C1, OR6C2, OR6C3, OR6C4, OR6C65, OR6C75, OR6C76, ORAI3, ORC3, OSBPL10, OSBPL6, OSGEP, OSTN, OTOA, PAK2, PALB2, PARP15, PARP9, PCCB, PCNX1, PCSK1, PDE11A, PDE4D, PDIA5, PER2, PGAP1, PHGDH, PHKG2, PIK3R2, PIP4P1, PISD, PLCH1, PLK1, PLP1, PMP2, PNP, POLR3E, POT1, PPARG, PPFIA2, PPP2R3A, PPP4R4, PRAME, PRKCB, PRPS1, PRRT3, PRSS36, PRSS8, PRTG, PSEN1, PSMA8, PTBP3, PYCR2, PYGO1, RAB33B, RAB6B, RADX, RALYL, RARB, RARRES1, RARS2, RASGRF2, RBM15B, RBM25, REC114, RGMB, RGS22, RIMS2, RIPPLY1, RIPPLY2, RNASE1, RNF128, RNF40, ROR1, RPEL1, RPL15, RPL5, RRM2B, RTP4, RWDD3, RXFP2, SBF1, SCEL, SCN10A, SCN1A, SCNN1B, SCO2, SEC63, SENP5, SENP6, SEPTIN1, SETD1A, SFI1, SGK1, SH3BP5L, SINHCAF, SLAIN1, SLC16A1, SLC24A3, SLC25A14, SLC25A24, SLC33A1, SLC35A1, SLC44A1, SLC49A4, SLC4A10, SLC5A8, SLC6A6, SMC4, SMC5, SMIM10L1, SMIM8, SNUPN, SNX8, SPOPL, SRCAP, SRPRB, SS18, ST3GAL3, STAC, STARD8, STEAP3, STK39, STT3B, SUSD5, SYCE3, SYCP2L, SYN2, TACR3, TAFA2, TAMM41, TAS2R42, TBC1D10B, TBC1D4, TBC1D8B, TCEAL7, THEMIS, THSD7B, TIGAR, TLCD4-RWDD3, TMCO5A, TMEM117*

Продолжение таблицы Г.2

	TMEM163, TMEM207, TMEM232, TMEM265, TMEM31, TMEM41A, TMEM43, TP63, TPRG1, TRABD, TRAF3IP1, TRANK1, TRIM59, TSC22D3, TTC21B, TTC29, TUBGCP6, TYMP, UBE2E1, UBFD1, UCMA, UGT3A1, VGLL4, VIPR1, VWA3A, WASHC3, XPC, ZC3H12B, ZC3H6, ZC3H8, ZCWPW2, ZMAT3, ZNF214, ZNF215, ZNF292, ZNF385B, ZNF385D, ZNF48, ZNF620, ZNF621, ZNF688, ZNF768, ZNF785
Гены, выявленные при сравнении долгоживущих и диких самок (n = 281)	*ACOD1, ACVR2A, ADGRF1, ADIPOQ, ALG11, ALX1, ANXA10, APBB1, ARFIP2, ARHGEF37, ARSI, ARTN, ATG7, ATP2A1, ATP7B, B2M, B4GALT6, BLOC1S1, BLOC1S5-TXNDC5, BMP6, BORCS5, C16orf82, C18orf25, C2orf66, C6orf15, CAMK2A, CAPRIN2, CCDC141, CCDC70, CCHCR1, CCNA1, CCP110, CD19, CD63, CDC23, CDC25C, CDK12, CDSN, CHP2, CLGN, CLN5, CNMD, COG5, COG7, COL11A1, COMMD6, COX6A1, CXCR4, DACH1, DCTN5, DCUN1D1, DGKA, DGKD, DGKG, DLEU7, DNHD1, DOCK4, DUX4, EDIL3, EDNRB, EEF2K, EFHC1, ELF1, ELOVL2, ENOX1, EPHA6, ERN2, F13A1, FAM124A, FAM189A1, FAM20C, FAM240C, FAM53C, FANCM, FARS2, FBXL3, FOXL3, FRY, GAS2L3, GATC, GDE1, GDF11, GFRA3, GJA3, GJB6, GP2, GPR39, GRIP1, HERC1, HERC3, HINT1, HK2, HPX, HS3ST2, IGSF6, IKBIP, INTS6, IPO11, IPO13, ITGA7, ITPRID2, KATNAL1, KCNH5, KCNH8, KCNIP1, KCNK3, KCNMB2, KCTD12, KDM3B, KHDRBS2, KIF20A, KIF3C, KITLG, KLF12, KLF5, KLHL1, LACTB, LAMA4, LHFPL3, LMO7, LRFN2, LRP1B, LYPD1, LYRM4, LYRM7, MANEA, MANSC1, MAP3K13, MAP3K5, MCM10, MEMO1, METTL7B, METTL9, MGAT4D, MGAT5, MIS18BP1, MLPH, MOSMO, MPHOSPH8, MTHFD1L, MYCBP2, NAV3, NCKAP5, NCR2, NDFIP2, NDUFAB1, NEK5, NPPC, NR2C2, NRTN, NRXN1, NUFIP1, NXPH2, OBI1, OR10A2, OR10A5, OR10P1, OR2AP1, OR6C1, OR6C3, OR6C4, OR6C65, OR6C75, ORC4, OTOA, PALB2, PARP4, PATL2, PCDH9, PDCD1, PDE11A, PDE4D, PDE7B, PDILT, PECR, PEX7, PGAP1, PHTF2, PIBF1, PLEKHA5, PLK1, PLK4, PLPPR1, PMEL, POLE4, POLR2M, POU4F1, PPFIA2, PPP1R14D, PRKCB, PRKD1, PRLH, PRMT3, PSMC2, PSORS1C1, PSORS1C2, PTN, PTPN18, PYM1, RAB10, RAB17, RABEP2, RABGAP1L, RAD18, RASL11A, RBM26, RCBTB2, RDH5, RHOV, RNASEH2B, RNF145, RNF17, RNF6, RPEL1, RPL21, RTP5, RUBCNL, SACS, SAG, SCEL, SCN3A, SCOC, SDR42E2, SECISBP2L, SENP6, SERPINE3, SESTD1, SH2B1, SINHCAF, SLAIN1, SLC25A3, SLC26A5, SLC35D3, SLC35F5, SLC44A1, SLC4A10, SLC5A8, SLC9A9, SOHLH2, SPG11, SPINT1, SPPL3, SRGAP3, SRSF9, SS18, ST3GAL3, SUGT1, SYCP2L, TACR1, TAFA2, TBC1D4, TCF19, TDRD3, TEAD1, THSD7B, TIMM10B, TMC5, TMEM163, TOP3B, TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, TRIAP1, TRIM3, TRIM69, TXNDC16, TXNDC5, UBFD1, UBLCP1, UCHL3, UCMA, UMOD, USP12, USP40, VGLL4, VPS18, VTI1A, VWA3A, ZMYM2, ZNF804B*

Продолжение таблицы Г.2

Гены, общие для двух сравнений (n = 73)	*ACOD1, ALX1, ANXA10, B4GALT6, C2orf66, CAPRIN2, CLN5, COG5, COG7, COMMD6, CXCR4, DACH1, DCTN5, DGKD, DGKG, EDNRB, EEF2K, ELOVL2, ENOX1, ERN2, FAM20C, FBXL3, FOXL3, HERC3, IGSF6, KCNH8, KCNMB2, KCTD12, LAMA4, LHFPL3, LMO7, MAP3K13, METTL9, MGAT5, MOSMO, MYCBP2, NAV3, NDUFAB1, NR2C2, OR10P1, OR2AP1, OR6C1, OR6C3, OR6C4, OR6C65, OR6C75, OTOA, PALB2, PDE11A, PDE4D, PGAP1, PLK1, PPFIA2, PRKCB, RPEL1, SCEL, SENP6, SINHCAF, SLAIN1, SLC44A1, SLC4A10, SLC5A8, SS18, ST3GAL3, SYCP2L, TAFA2, TBC1D4, THSD7B, TMEM163, UBFD1, UCMA, VGLL4, VWA3A*

Таблица Г.3 – Результаты анализа функционального обогащения 73 генов, общих для двух сравнений самок соболя

Биологический процесс	**GO ID**	**Количество генов**	**FDR**	**Гены**
Созревание нейронов	GO:0042551	3	0,04194	*B4GALT6,CLN5,EDNRB,MAP3K13*
Отрицательная регуляция сигнального пути фосфолипазы С / протеинкиназы С	GO:0160195	2	0,04194	*DGKD,DGKG*

Таблица Г.4 – Миссенс-варианты, классифицированные PolyPhen-2 как possibly damaging или probably damaging

Ген	**Положение в геноме**	**Аминокислотная замена**	**Прогноз PolyPhen-2**	**Оценка PolyPhen-2 (pph2_prob)**	**Консервативность соответствующей позиции**	**Частота ALT: исследуемые / фермерские / дикие самки**	**p-value (фермерские)**	**p-value (дикие)**
ASPM	Scaffold5115:2189277	p.(Arg1940Ser)	possibly damaging	0,931	32/39 (82,1 %)	0,500 / 0 / 0,091	0,0097	0,0237
ASPM	Scaffold5115:2192158	p.(Gln2900Arg)	probably damaging	1,000	34/34 (100 %)	0,500 / 0 / 0,150	0,0097	0,1534
COQ7	Scaffold498:70749	p.(Ser36Thr)	possibly damaging	0,500	38/39 (97,4 %)	0,438 / 0,083 / 0	0,1026	0,0010
DNAJC21	Scaffold1368:6326422	p.(Thr146Met)	possibly damaging	0,529	37/40 (92,5 %)	0,438 / 0,214 / 0,200	0,1319	0,3521
FBXO43	Scaffold898:543019	p.(Glu78Gly)	probably damaging	0,979	32/40 (80,0 %)	0,500 / 0,143 / 0,188	0,1026	0,1451

Продолжение таблицы Г.4

HIPK4	Scaffold 2441:33 2902	p. (Gly404 Ser)	probably damaging	1,000	35/38 (92,1 %)	0,438 / 0,143 / 0,136	0,0406	0,0698
ILDR1	Scaffold 3234:20 59997	p. (Arg403 Cys)	probably damaging	0,979	21/35 (60,0 %)	0,375 / 0,143 / 0	0,0406	0,0023
MOS	Scaffold 2800:61 08843	p. (Gly155 Ser)	probably damaging	0,999	39/40 (97,5 %)	0,375 / 0,200 / 0,222	0,2929	0,3348
PPM1N	Scaffold 2611:45 19315	p. (Ser274 Pro)	probably damaging	0,999	40/40 (100 %)	0,438 / 0,083 / 0,250	0,1026	0,1968
RESF1	Scaffold 1401:99 1440	p. (Ala100 3Thr)	probably damaging	0,991	26/36 (72,2 %)	0,375 / 0,143 / 0,300	0,0406	0,3665
RESF1	Scaffold 1401:99 0717	p. (His124 4Asn)	possibly damaging	0,906	25/38 (65,8 %)	0,375 / 0,167 / 0,313	0,1026	0,6084
RREB1	Scaffold 2597:16 5941	p. (Thr44M et)	probably damaging	0,974	22/39 (56,4 %)	0,375 / 0,071 / 0,200	0,0406	0,1534
SYBU	Scaffold 2813:30 50834	p. (Ala432 Pro)	possibly damaging	0,852	9/40 (22,5 %)	0,438 / 0,143 / 0,375	0,0406	0,3246
VGLL4	Scaffold 2561:44 08500	p. (Arg85H is)	probably damaging	1,000	40/40 (100 %)	0,375 / 0 / 0	0,0210	0,0015

Таблица Г.5 – Частоты альтернативных аллелей миссенс-вариантов у исследуемых самок соболя из двух хозяйств

Ген	Аминокислотная замена	«Русский соболь» (n = 4), AF (AC/AN)	«Салтыковский» (n = 4), AF (AC/AN)
ASPM	p.(Arg1940Ser)	0,250 (2/8)	0,750 (6/8)
ASPM	p.(Gln2900Arg)	0,250 (2/8)	0,750 (6/8)
COQ7	p.(Ser36Thr)	0,375 (3/8)	0,500 (4/8)
DNAJC21	p.Thr146Met	0,500 (4/8)	0,375 (3/8)
FBXO43	p.Glu78Gly	0,500 (4/8)	0,500 (3/6)
HIPK4	p.Gly404Ser	0,250 (2/8)	0,625 (5/8)
ILDR1	p.Arg403Cys	0,500 (4/8)	0,250 (2/8)
MOS	p.Gly155Ser	0,375 (3/8)	0,375 (3/8)
PPM1N	p.Ser274Pro	0,500 (4/8)	0,375 (3/8)
RESF1	p.Ala1003Thr	0,375 (3/8)	0,375 (3/8)
RESF1	p.His1244Asn	0,375 (3/8)	0,375 (3/8)
RREB1	p.Thr44Met	0,375 (3/8)	0,375 (3/8)
SYBU	p.Ala432Pro	0,500 (4/8)	0,375 (3/8)
VGLL4	p.(Arg85His)	0,500 (4/8)	0,250 (2/8)

* Здесь AF – частота альтернативного аллеля, AC/AN – число альтернативных аллелей / общее число учтённых аллелей.

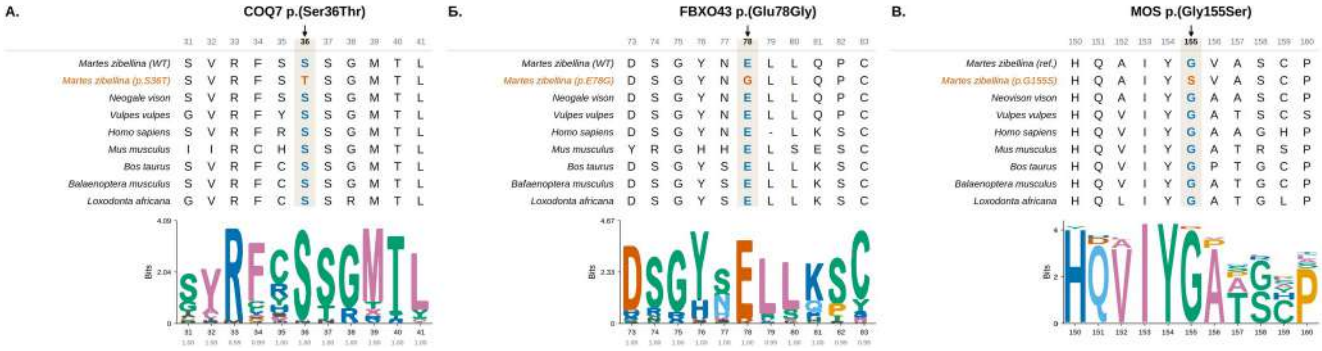


Рисунок Г.3 – Эволюционная консервативность аминокислотных позиций вариантов COQ7 p.(Ser36Thr) (А), FBXO43 p.Glu78Gly (Б) и MOS p.(Gly155Ser) (В). Представлены фрагменты множественного выравнивания белковых последовательностей млекопитающих и соответствующие логотипы последовательностей. Стрелками обозначены позиции аминокислотных замен

ПРИЛОЖЕНИЕ Д
Дополнительные результаты анализа эволюционно ускоренных геномных регионов у куньих с отложенной имплантацией

Таблица Д.1 – Число эволюционно ускоренных регионов и показатель N50 скаффолдов геномных сборок куньих

Вид	**Сборка UCSC 470-way**	**Число ЭУР**	**N50 скаффолдов, п. н.**
Martes zibellina	HLmarZib1	6 037	5 199 373
Lontra canadensis	HLlonCan1	4 486	18 460 785
Enhydra lutris kenyoni	enhLutKen1	3 935	38 751 465
Mustela erminea	HLmusErm1	3 544	130 149 454
Neovison vison	HLneoVis1	5 668	6 814 223

Таблица Д.2 – Гены, выявленные при аннотации эволюционно ускоренных регионов, общих не менее чем для трех видов куньих с отложенной имплантацией

Способ аннотации	**Гены**
Непосредственное перекрытие ЭУР с генами	*AGBL4, AP2B1, ARMH3, ATP6V1A, BMP2K, CABP7-DT, CALCRL, CALCRL-AS1, CCDC163, CEP290, COPG2, CRLS1, DIP2B, EBF1, EEF1A1P16, EFCAB6, FNIP2, FZD3, GYG1P1, GYG1P3, HECTD1, IFT80, KIF13B, LINC02109, LINC02307, LINC02994, LRP11, LY96, MBD5, MIR4422HG, MSR1, MYH15, NHEJ1, NUBPL, OR11G2, OR7E13P, OR7E33P, POLR1B, PREX2, PRKG1, PRSS23, RAB3B, RAET1E-AS1, SEPHS1P1, SLC36A4, SPECC1P1, TENM2, TFPI, TMEM241, TPST1, TPTE2P6, TRIM33, TRIM59-IFT80, USF3, ZNF704.*
Расположение ЭУР в регуляторных доменах	*ADORA2B, ARHGAP5, ARMH3, ATF1, ATP6V1A, BEND5, BMP2K, BTBD1, C12orf50, C3orf80, C8orf34, CABLES1, CABP7, CALCRL, CEP290, CHCHD5, COPG2, CRLS1, CSTF2T, DIP2B, DKK2, DTHD1, EBF1, ENSG00000288208, EPC2, EXTL3, FNIP2, FSCB, FZD3, GDAP1, GPAT3, GRAMD1C, HECTD1, HHLA2, HMBOX1, IHH, IZUMO3, KCNIP2, KCNU1, KCTD7, KIF13B, LRP11, LRRN4, LY96, MAN1A2, MEST, MSR1, MTNR1B, MYH15, NF2, NHEJ1, NKX6-1, NRDC, NUBPL, NWD2, OR11G2, OR11H6, ORC4, PAPSS1, PAQR3, PEX12, POLR1B, PREX2, PRKG1, PRPF40A, PSKH2, RAB3B, RASL10B, RPRM, SIDT1, SLC36A4, SLC7A13, SMC4, SPMIP2, STRN3, SYT6, TBC1D26, TENM2, TESK2, TFPI, TM6SF1, TMEFF2, TMEM241, TPST1, TRIM33, TUSC1, TUSC3, USF3, VIPR2, VTCN1, ZBTB10, ZNF704, ZSWIM2.*

Таблица Д.3 – ЭУР у куньих с отложенной имплантацией, перекрывающиеся с кандидатными цис-регуляторными элементами генома человека

Координаты ЭУР (hg38)	**Виды с ЭУР**	**ENCODE cCRE ID**	**Класс cCRE**	**Ближайший ген (тип гена; расстояние до TSS, п. н.)**
chr1:117 332 087–117 332 136	канадская выдра, калан, американская норка	EH38E1380372	dELS	*ENSG00000271427* (длинная некодирующая РНК; 33 178)

Продолжение таблицы Д.3

chr2:187 403 816–187 403 865	соболь, калан, американская норка	EH38E3389551	dELS	*GAPDHP59* (процессированный псевдоген; 11 714)
chr2:187 403 977–187 404 026	соболь, калан, американская норка	EH38E2059073	dELS	*GAPDHP59* (процессированный псевдоген; 11 293)
chr2:187 404 127–187 404 176	соболь, калан, американская норка	EH38E2059073	dELS	*GAPDHP59* (процессированный псевдоген; 11 293)
chr2:187 554 322–187 554 371	соболь, канадская выдра, американская норка	EH38E3389626	PLS	*TFPI* (белок-кодирующий; 0)
chr2:192 407 909–192 407 958	калан, горностай, американская норка	EH38E3391513	dELS	*TMEFF2* (белок-кодирующий; 212 824)
chr5:158 880 792–158 880 841	соболь, калан, горностай	EH38E2425663	dELS	*EBF1* (белок-кодирующий; 40 600)
chr5:167 260 045–167 260 094	соболь, канадская выдра, американская норка	EH38E3676186	CA-CTCF	*ENSG00000254365* (длинная некодирующая РНК; 34 081)
chr6:149 863 606–149 863 655	канадская выдра, калан, горностай	EH38E4420916	pELS	*RAET1E-AS1* (длинная некодирующая РНК; 99)
chr6:149 864 141–149 864 190	соболь, канадская выдра, калан, горностай	EH38E3740314	PLS	*LRP11* (белок-кодирующий; 0)
chr8:28 556 878–28 556 927	соболь, канадская выдра, калан, американская норка	EH38E2620479	dELS	*RNA5SP259* (псевдоген рРНК; 26 171)
chr8:74 013 751–74 013 800	соболь, канадская выдра, калан	EH38E4472188	dELS	*LY96* (белок-кодирующий; 22 286)
chr14:31 164 498–31 164 547	соболь, калан, американская норка	EH38E1706093	dELS	*RNU6-541P* (малая ядерная РНК; 21 545)
chr14:44 269 584–44 269 633	калан, горностай, американская норка	EH38E4104737	CA	*YWHAZP1* (процессированный псевдоген; 21 984)
chr17:15 906 087–15 906 136	калан, горностай, американская норка	EH38E4156753	CA	*ADORA2B* (белок-кодирующий; 38 759)

Примечание – PLS (promoter-like signature) – промотороподобный элемент; pELS (proximal enhancer-like signature) – проксимальный энхансероподобный элемент; dELS (distal enhancer-like signature) – дистальный энхансероподобный элемент; CA (chromatin accessibility) – участок доступного хроматина; CA-CTCF (chromatin accessibility with CTCF) – участок доступного хроматина, связанный с фактором CTCF.

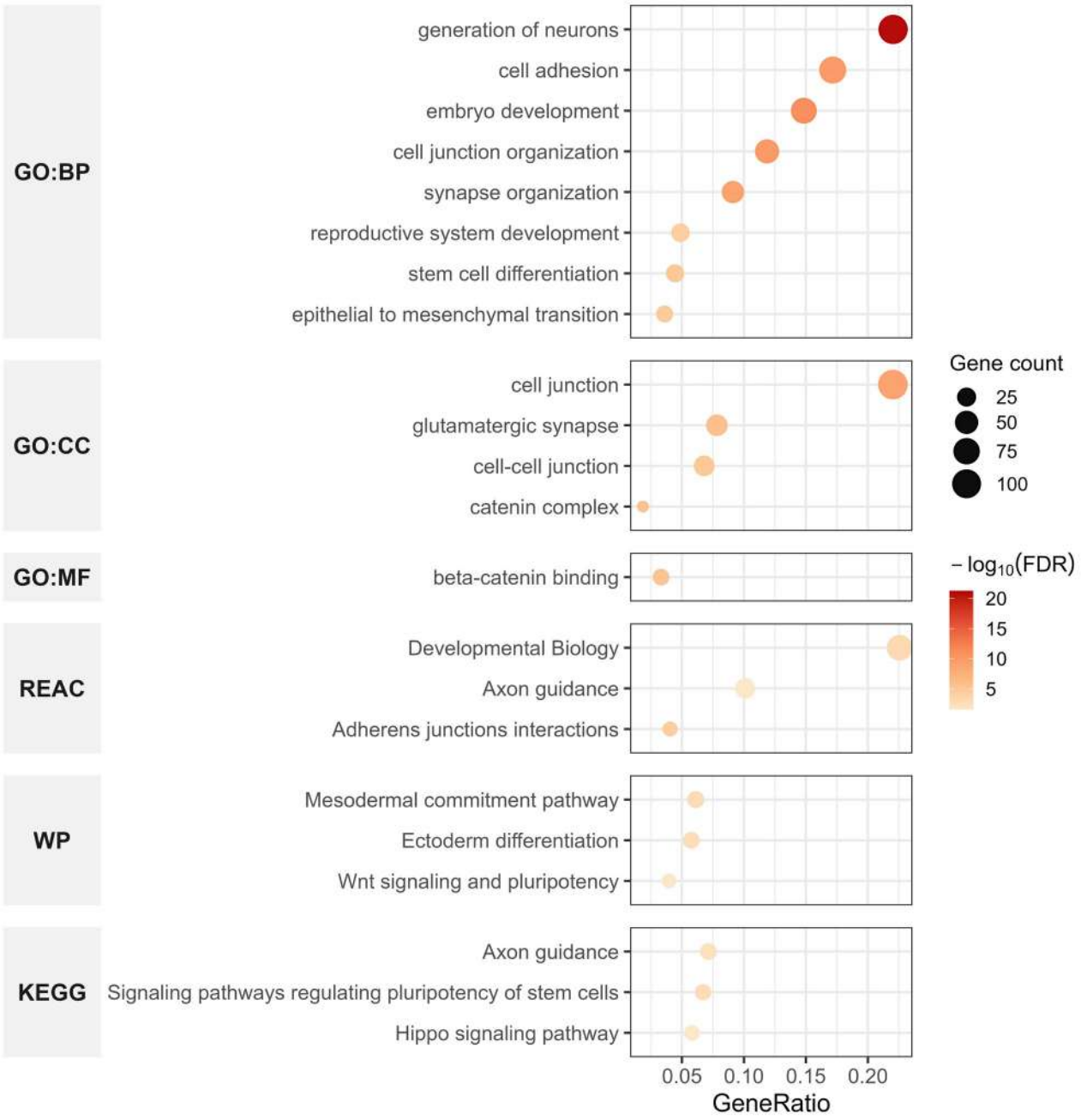


Рисунок Д.1 – Функциональное обогащение генов, в регуляторных доменах которых эволюционно ускоренные регионы были выявлены у всех пяти исследованных видов куньих с отложенной имплантацией

Таблица Д.4 – Список дифференциально экспрессирующихся транскриптов в матке американской норки в период диапаузы и после реактивации бластоцисты (по данным Cao et al., 2019)

Ген	ID транскрипта	$\log_2$FC	Скорр. p	Экспрессия выше
ADAMTS9	Cluster-62068.75403	+4,2264	$4{,}79 \times 10^{-6}$	после реактивации
ADAMTS9	Cluster-62068.81648	+2,4023	$5{,}08 \times 10^{-6}$	после реактивации
ADAMTS9	Cluster-62068.81639	+2,2496	$2{,}62 \times 10^{-5}$	после реактивации
ADAMTS9	Cluster-62068.138482	+2,3174	0,03757	после реактивации
ADK	Cluster-62068.95538	+1,7032	0,00048538	после реактивации
ADK	Cluster-62068.96484	+1,5366	0,0405	после реактивации

Продолжение таблицы Д.4

ALCAM	Cluster-62068.78547	+2,4676	0,00022932	после реактивации
ALCAM	Cluster-62068.78550	+1,4275	0,013459	после реактивации
ALCAM	Cluster-62068.106996	+1,4401	0,024515	после реактивации
ALCAM	Cluster-62068.78548	+1,3162	0,036655	после реактивации
ANK3	Cluster-62068.141324	−3,4255	$3{,}25 \times 10^{-5}$	во время диапаузы
ANXA3	Cluster-62068.150046	+2,8729	0,012905	после реактивации
ATG4C	Cluster-62068.84267	+1,5892	0,00020905	после реактивации
ATG4C	Cluster-62068.76244	+1,3344	0,025194	после реактивации
ATP6V1A	Cluster-62068.99323	−5,2223	$1{,}64 \times 10^{-11}$	во время диапаузы
ATP6V1A	Cluster-62068.105990	+1,6741	0,038553	после реактивации
BCAT1	Cluster-62068.107255	+2,58	0,02412	после реактивации
BCL2	Cluster-62068.163425	−1,1981	0,0083748	во время диапаузы
BMPR1B	Cluster-62068.135515	+1,2115	0,0011895	после реактивации
BRINP3	Cluster-62068.182487	+4,1471	$8{,}35 \times 10^{-6}$	после реактивации
CBLB	Cluster-62068.151925	−2,7301	0,043814	во время диапаузы
COL3A1	Cluster-62068.94335	+1,3013	0,0063872	после реактивации
COL3A1	Cluster-62068.95262	+1,3469	0,0071682	после реактивации
COL3A1	Cluster-62068.96843	+3,1792	0,007334	после реактивации
COL3A1	Cluster-62068.92353	+1,2896	0,01449	после реактивации
COL5A2	Cluster-62068.106457	+1,1645	0,043352	после реактивации
DCLK1	Cluster-62068.117258	+1,6564	0,033185	после реактивации
DNM3	Cluster-62068.140341	+1,5695	0,0391	после реактивации
DYSF	Cluster-62068.147937	+1,2279	0,038181	после реактивации
FAM49A	Cluster-62068.113790	+4,7304	$2{,}65 \times 10^{-8}$	после реактивации
FAT3	Cluster-62068.183579	−1,7517	0,00055331	во время диапаузы
FOXN2	Cluster-62068.72605	+5,0428	$7{,}76 \times 10^{-10}$	после реактивации
FUT10	Cluster-62068.130037	+2,6308	0,00012069	после реактивации
FUT10	Cluster-62068.130035	−1,2665	0,023223	во время диапаузы
FZD3	Cluster-62068.55687	+1,2479	0,010753	после реактивации
GREB1L	Cluster-62068.44460	−4,6868	$3{,}79 \times 10^{-8}$	во время диапаузы
GREB1L	Cluster-62068.146858	−4,2705	$6{,}49 \times 10^{-6}$	во время диапаузы
GREB1L	Cluster-62068.128709	+3,4926	0,0011174	после реактивации
HECTD1	Cluster-62068.82680	−5,2523	$7{,}76 \times 10^{-10}$	во время диапаузы
IFT172	Cluster-62068.51321	−1,9271	0,00076604	во время диапаузы
IGF1	Cluster-62068.98003	+2,0815	$9{,}7 \times 10^{-7}$	после реактивации
IGF1	Cluster-62068.109051	+2,2371	$1{,}83 \times 10^{-6}$	после реактивации
IGF1	Cluster-62068.128641	+1,8167	0,0013717	после реактивации
IGF1	Cluster-62068.116216	+1,8892	0,0014647	после реактивации
KMT2E	Cluster-62068.110053	−1,1758	0,041102	во время диапаузы
LHFPL3	Cluster-62068.185925	−3,539	0,00076878	во время диапаузы
MAT2B	Cluster-62068.89125	+2,2564	0,002648	после реактивации
MIS18BP1	Cluster-62068.173980	−3,6033	0,00070011	во время диапаузы
MTHFD2	Cluster-62068.96375	+1,8764	0,00024256	после реактивации
MYCN	Cluster-74011.0	+2,4376	0,047	после реактивации
N4BP1	Cluster-62068.76334	−6,5331	$1{,}52 \times 10^{-29}$	во время диапаузы
NOG	Cluster-62068.111614	+2,4471	0,0087039	после реактивации
NREP	Cluster-62068.99528	+1,2865	0,0008614	после реактивации
ORC4	Cluster-62068.76480	+3,4902	0,0013018	после реактивации
OSR1	Cluster-62068.167517	−1,9092	0,014574	во время диапаузы

Продолжение таблицы Д.4

PACRG	Cluster-62068.49806	+1,9	0,035655	после реактивации
PCCA	Cluster-62068.138577	+2,8649	0,012905	после реактивации
PDE1C	Cluster-62068.102523	+2,9927	0,00030812	после реактивации
PDZRN3	Cluster-62068.75920	−4,1003	$1{,}69 \times 10^{-5}$	во время диапаузы
PHLPP1	Cluster-62068.93317	+1,9892	0,016944	после реактивации
PIK3C3	Cluster-62068.121796	+0,86341	0,047	после реактивации
PKN2	Cluster-62068.110942	−3,4411	0,0012682	во время диапаузы
PMFBP1	Cluster-62068.123720	−3,2677	0,0034239	во время диапаузы
PSD3	Cluster-62068.79339	−4,953	$2{,}31 \times 10^{-8}$	во время диапаузы
PTPRD	Cluster-62068.111992	+0,90988	0,044108	после реактивации
RAPGEF4	Cluster-62068.80525	+2,6804	0,00012844	после реактивации
RAPGEF4	Cluster-62068.135412	+2,678	0,031162	после реактивации
RORA	Cluster-62068.46629	+3,4489	0,0013715	после реактивации
SBF2	Cluster-62068.134592	+1,2711	0,0088023	после реактивации
SYT10	Cluster-62068.77058	−1,6007	0,0062056	во время диапаузы
TANK	Cluster-62068.160427	+2,9721	0,010558	после реактивации
TCF12	Cluster-62068.120490	+1,6219	0,035665	после реактивации
TMEM161B	Cluster-62068.57003	+4,445	$6{,}12 \times 10^{-7}$	после реактивации
TPST1	Cluster-62068.49587	+4,0388	$3{,}33 \times 10^{-5}$	после реактивации
TUSC3	Cluster-62068.96397	+1,0517	0,042185	после реактивации
VIPR2	Cluster-62068.123209	+2,4942	0,049546	после реактивации
WNT5A	Cluster-62068.121058	−0,8196	0,0073499	во время диапаузы
ZNF704	Cluster-62068.185158	−3,6231	0,00062478	во время диапаузы
ZSWIM2	Cluster-62068.163671	−3,409	0,00029132	во время диапаузы
ZSWIM2	Cluster-62068.190702	−2,9169	0,01955	во время диапаузы

Примечание – Отрицательные значения $\log_2$FC соответствуют повышению экспрессии в период диапаузы, положительные – более высокой экспрессии после реактивации бластоцисты.

Таблица Д.5 – Список дифференциально экспрессирующихся транскриптов в яичниках американской норки при выходе из эмбриональной диапаузы (по данным Fan et al., 2021).

Ген	ID гена	$\log_2$FC	Скорр. p	Экспрессия выше
AGTR1	ENSMPUG00000019341	−1,2858	0,0009361	во время диапаузы
BMP2	ENSMPUG00000006377	+0,7855	0,046709	после реактивации
BMPR1B	ENSMPUG00000002097	+1,0176	0,0007073	после реактивации
CDH10	ENSMPUG00000015255	+2,9565	0,01661	после реактивации
CPEB2	ENSMPUG00000002117	−0,93696	0,003779	во время диапаузы
EPHA6	ENSMPUG00000002679	+1,1895	0,000535	после реактивации
EPHA6	ENSMPUG00000002693	+1,0681	0,040084	после реактивации
FAR2	ENSMPUG00000010970	+1,1721	0,0003905	после реактивации
GMDS	ENSMPUG00000000399	+0,8937	0,0087584	после реактивации
KLF4	ENSMPUG00000007236	+1,905	0,016673	после реактивации
LRRN4	ENSMPUG00000006354	+0,91951	0,034122	после реактивации
NR5A2	ENSMPUG00000010466	+1,1302	0,0047984	после реактивации
NRG1	ENSMPUG00000010197	−1,17	0,040062	во время диапаузы
PAPPA	ENSMPUG00000001696	+1,3773	0,0006299	после реактивации
PDE1A	ENSMPUG00000002231	+0,89302	0,023921	после реактивации

PMFBP1	ENSMPUG00000007758	+3,5915	0,0021389	после реактивации

Продолжение таблицы Д.5

RBFOX1	ENSMPUG00000014822	+2,6388	$7{,}349 \times 10^{-24}$	после реактивации
ROBO1	ENSMPUG00000014964	−0,73572	0,041582	во время диапаузы
RTL1	ENSMPUG00000019172	−3,5665	0,011891	во время диапаузы
SATB2	ENSMPUG00000007972	−1,1923	0,037159	во время диапаузы
SEMA3C	ENSMPUG00000018291	+2,0628	$1{,}881 \times 10^{-14}$	после реактивации
SH3GL2	ENSMPUG00000003993	−1,0623	0,0031656	во время диапаузы
SLC4A5	ENSMPUG00000007835	+2,0624	$1{,}249 \times 10^{-5}$	после реактивации
STXBP5L	ENSMPUG00000012326	−1,6444	0,0007453	во время диапаузы
STXBP5L	ENSMPUG00000008239	−1,485	0,025397	во время диапаузы
TMEFF2	ENSMPUG00000012733	+3,0805	$6{,}959 \times 10^{-6}$	после реактивации
ZPLD1	ENSMPUG00000011794	−5,1472	$3{,}111 \times 10^{-6}$	во время диапаузы

Примечание – Отрицательные значения $\log_2$FC соответствуют повышению экспрессии в период диапаузы, положительные – более высокой экспрессии после реактивации бластоцисты.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е
Дополнительные результаты анализа генетических вариантов у женщин с нарушениями созревания ооцитов и аномалиями структуры блестящей оболочки

Таблица Е.1 – Кандидатные генетические варианты, выявленные у пациентки с остановкой созревания ооцитов

Ген	**Позиция на геноме** (GRCh38)	**Вариант**	**Замена кДНК**	**Эффект на белок**	**Тип варианта**	**GnomAD***	**SIFT†**	**PolyPhen†**	**Генотип**
TUBB8	10:47865	rs869025609	c.527C>T	p.(Ser176Leu)	Миссенс	0.000 (T)	Deleterious, low confidence	Probably damaging	0/1
VPS13D	1:12277831	rs79282181	c.4243G>A	p.Asp1415Asn	Миссенс	0,002795 (A)	Deleterious	Possibly damaging	1/1
CASP10	2:201209444	rs200540853	c.1297G>A	p.Glu433Lys	Миссенс	0,0002051 (A)	Deleterious	Probably damaging	0/1
AMACR	5:34004615	rs773780945	c.511C>T	p.Arg171Cys	Миссенс	0,00004957 (T)	Deleterious	Probably damaging	0/1
TMEM231	16:75541371	rs369010440	c.749G>A	p.Arg250Gln	Миссенс	0,00009313 (A)	Tolaerated	Possibly damaging	0/1
FSCN2	17:81529222	rs150620080	c.691C>T	p.Pro231Ser	Миссенс	0,0006604 (T)	Deleterious	Probably damaging	0/1
FAAH2	X:57448667	rs147173444	c.1372G>T	p.Ala458Ser	Миссенс	0,0002712 (T)	Deleterious	Probably damaging	0/1

* частота соответствующего варианта в базах данных gnomAD; † оценка патогенности варианта с помощью SIFT и PolyPhen-2.

Таблица Е.2 – Аннотация варианта *ZP4* p.(Leu342Pro)

Ген	**Позиция на геноме** (GRCh37)	**Вариант**	**Замена кДНК**	**Эффект на белок**	**Тип варианта**	**GnomAD***	**SIFT†**	**PolyPhen†**	**Генотип**
ZP4	1:238048826 A/G	rs1254095560	c.1025T>C	p.(Leu342Pro)	Миссенс	0.00003186 (G)	deleterious	probably_ damaging	0/1

* частота соответствующего варианта в базах данных gnomAD; † оценка патогенности варианта с помощью SIFT и PolyPhen-2.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Дополнительные результаты сравнительно-геномного анализа эволюционно ускоренных регионов у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием

Таблица Ж.1 – Число ЭУР и показатель непрерывности геномных сборок у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием

Вид	**Сборка UCSC 470-way**	**Число ЭУР**	**N50 скаффолдов, п. н.**
Orcinus orca	orcOrc1	7 591	12 735 091
Delphinapterus leucas	HLdelLeu2	5 352	31 183 418
Monodon monoceros	HLmonMon1	5 274	107 566 389

Таблица Ж.2 – Репродуктивные и демографические характеристики видов зубатых китов, использованных для анализа пострепродуктивного долголетия

Вид	**PrR (мин.-макс.)**	**Максимальный возраст репродуктивной активности, лет**	**Продолжительность жизни самок, лет**	**Половое созревание самок, дни**	**Беременность, дни**	**Интервал между рождениями, дни**
Документированная менопауза и пострепродуктивное долголетие (ПРД)						
Нарвал (*Monodon monoceros*)	0,24 (0,19-0,29)	34[1] / 41[2]	77 (69-86)	2191	450	914
Косатка (*Orcinus orca*)	0,30 (0,24-0,37)	41[3]	60 (54-66)	3780	435	1096
Белуха (*Delphinapterus leucas*)	0,24 (0,19-0,33)	47[1] / 69[3]	54 (52-56)	1644	416	1004
Менопауза и ПРД не документированы						
Длинноплавниковая гринда (*Globicephala melas*)	–	–	45 (44-46)	2470	450	1460
Тихоокеанский белобокий дельфин (*Lagenorhynchus obliquidens*)	–	–	40 (37-45)	3832	320	–
Индийская афалина (*Tursiops aduncus*)	–	–	37 (34-41)	4380	365	1460
Peponocephala electra	–	–	41 (38-45)	4290	365	–

Продолжение таблицы Ж.2

Обыкновенная морская свинья (*Phocoena phocoena*)	–	–	17 (17-18)	1055	320	365
Карликовый кашалот (*Kogia breviceps*)	–	–	20 (17-25)	1825	335	730

Примечание – PrR – показатель пострепродуктивного периода. Продолжительность жизни приведена как медианная максимальная продолжительность жизни самок. В скобках указан 95 %-й байесовский доверительный интервал. [1] Возраст определен по числу желтых тел и белых тел яичника. [2] По числу желтых тел. [3] По зарегистрированным беременностям. Данные приведены по de Magalhães and Costa (2009), Fox et al. (2017), Ellis et al. (2018, 2024), Marino (1998).

Таблица Ж.3 – Предполагаемые изменения сайтов связывания транскрипционных факторов в общих эволюционно ускоренных регионах у трех видов зубатых китов с пострепродуктивным долголетием

Координаты ЭУР (hg38)	**Ассоциированный ген**	**Предполагаемая утрата мотивов**	**Предполагаемое появление мотивов**
chr1:162600320-162600369	*UAP1*	*CRX, GSC2, OTX1, PITX3*	–
chr10:64069515-64069564	Межгенный регион	*OSR1, OSR2, ZNF140*	–
chr10:69557765-69557814	Межгенный регион	*PRDM5*	–
chr12:12200497-12200546	*LRP6*	*FOXC1, FOXC2, FOXL2*	–
chr13:43478782-43478831	*ENOX1*	–	*STAT2*
chr15:73299840-73299889	*NEO1, MIR12135*	–	*FOXE1*
chr16:25300453-25300502	Межгенный регион	*ZNF85*	–
chr2:83173814-83173863	Межгенный регион	*EOMES, TBX18, TBX2, TBX20, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6*	–
chr4:183099131-183099180	*WWC2-AS2, WWC2*	–	*ELF4, ELK1, ELK3, ELK4, ETV5, FEV*
chr4:183099181-183099230	*WWC2-AS2, WWC2*	–	*ZNF692*
chr5:11904199-11904148	*CTNND2*	*ZNF320*	–
chr8:121873135-121873184	Межгенный регион	*NR1I2, NR1I3, NR6A1*	–
chr8:121873185-121873234	Межгенный регион	*ZNF136*	–

Примечание – Представлены 34 предполагаемых изменения сайтов связывания транскрипционных факторов, выявленные в 13 ЭУР, общих для косатки, белухи и нарвала, при использовании обеих баз данных мотивов JASPAR2024 и HOCOMOCO

Таблица Ж.4 – Результаты обработки данных ChIP-seq печени дельфинов рода *Delphinus* и их сопоставления с эволюционно ускоренными регионами зубатых китов

А. Обработка данных ChIP-seq печени дельфинов рода *Delphinus*

Класс регуляторных элементов	Гистоновая модификация	Исходное число пиков	Исключено из категории энхансероподобных из-за перекрытия с H3K4me3	Число пиков после классификации	Число пиков после фильтрации по доле выравнивания ≥50 %
Энхансероподобные	H3K27ac	29 909	15 183	14 726	8 575
Промотороподобные	H3K4me3	17 239	0	17 239	11 676

Б. Число ЭУР исследуемых видов, перекрывающихся с соответствующими участками ChIP-seq после переноса координат

Вид	ЭУР, перекрывающиеся с энхансероподобными участками	ЭУР, перекрывающиеся с промотороподобными участками	ЭУР, перекрывающиеся с обоими классами	Общее число уникальных ЭУР
Косатка (*Orcinus orca*)	107	235	0	342
Белуха (*Delphinapterus leucas*)	112	125	0	237
Нарвал (*Monodon monoceros*)	92	156	0	248

Примечание – Энхансероподобными считали участки, обогащенные H3K27ac и не перекрывающиеся с участками H3K4me3. Участки, обогащенные H3K4me3, относили к промотороподобным. Для последующего анализа сохраняли пики, не менее 50 % длины которых удалось сопоставить с последовательностями референсного генома человека (hg38). Перекрытие с ЭУР определяли после переноса координат из сборки turTru1 в hg38.

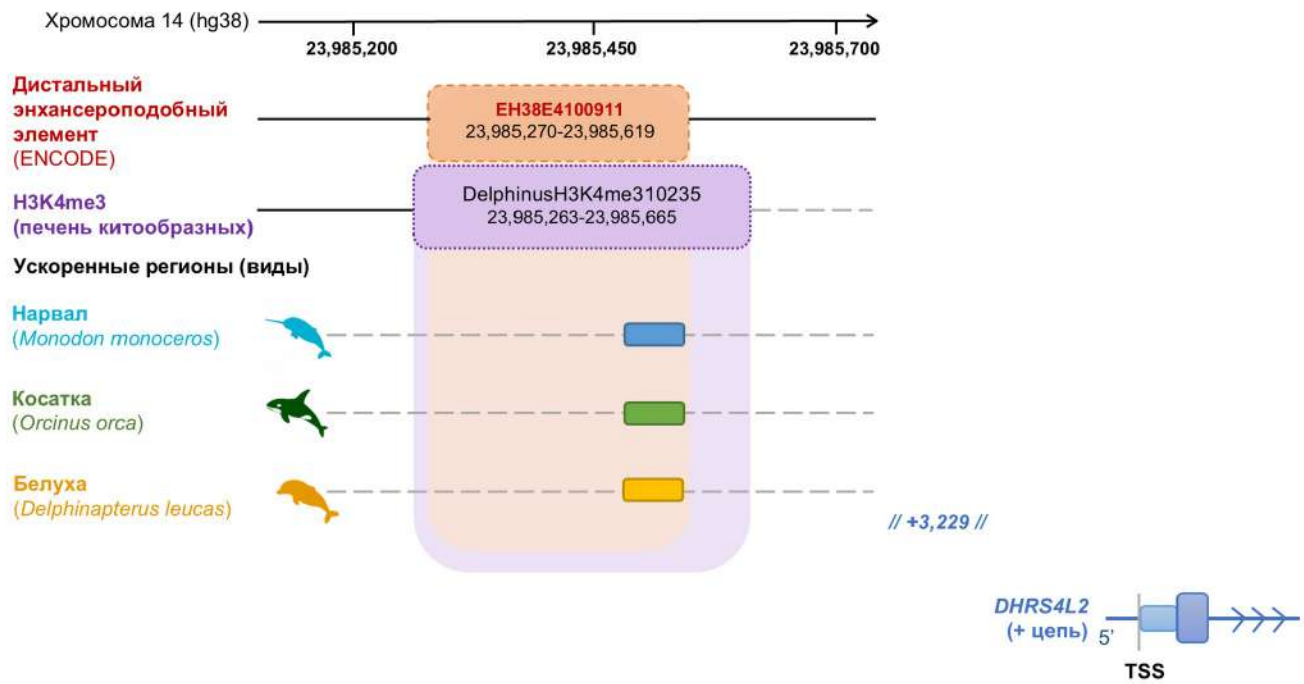


Рисунок Ж.1 – Схематическое расположение общего ускоренного региона у косатки, нарвала и белухи относительно элемента ENCODE и пика H3K4me3 вблизи гена DHRS4L2. Пик H3K4me3 DelphinusH3K4me310235 показан схематично. После проекции координат из сборки turTru1 на геном человека (hg38) исходный пик представлен пятью фрагментами: chr14:23 985 263-23 985 335, 23 985 340-23 985 355, 23 985 393-23 985 410, 23 985 414-23 985 587 и 23 985 591-23 985 665

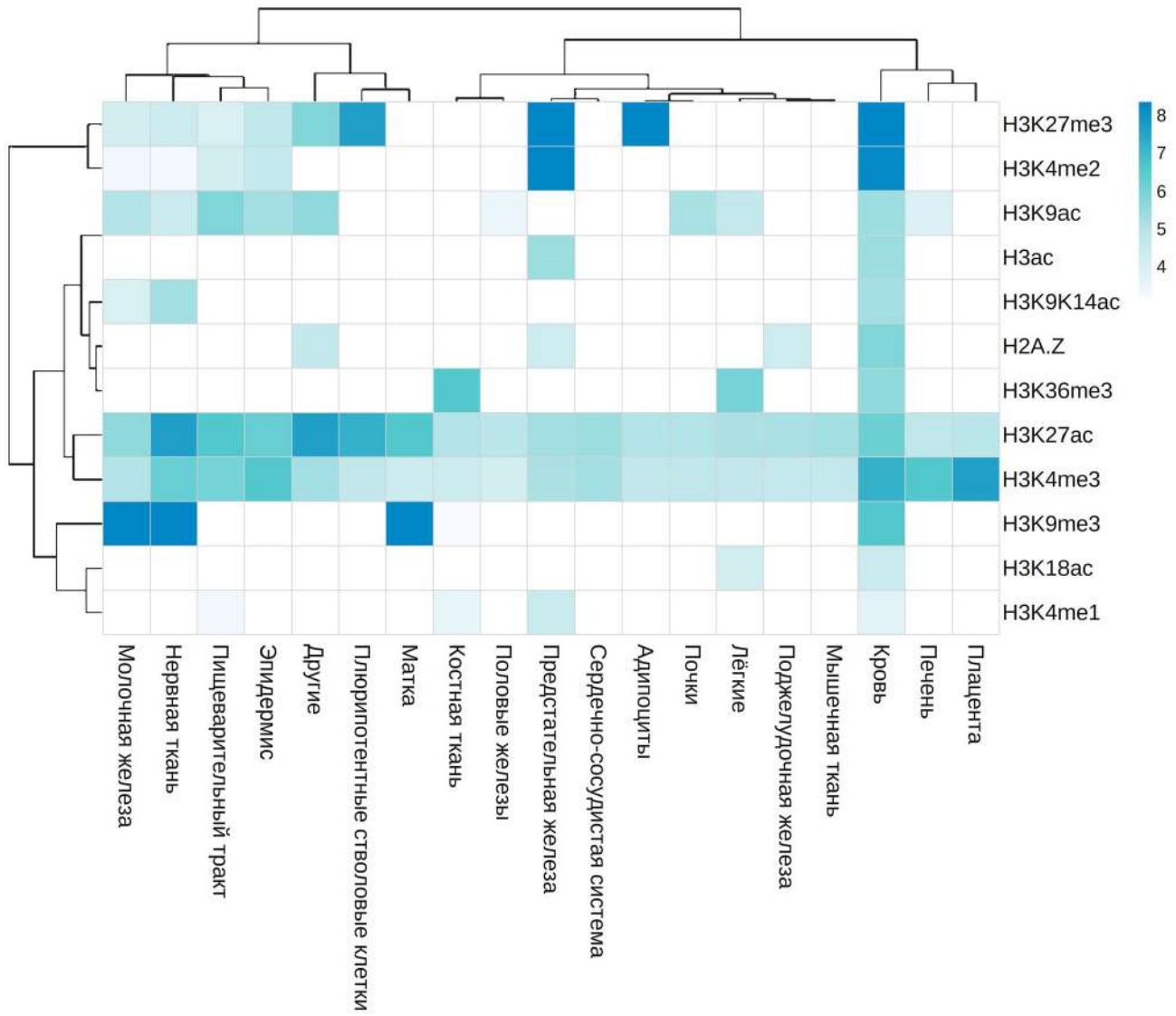


Рисунок Ж.2 – Эпигенетическое обогащение ускоренных регионов в тканях человека. Тепловая карта показывает обогащение УР по модификациям гистонов в различных тканях и классах клеток человека. Цвет отражает $\log_2$ максимальной кратности обогащения относительно случайных геномных регионов. Статистически значимыми считали значения при FDR < 5 % (in silico ChIP, ChIP-Atlas). Белые ячейки обозначают отсутствие значимого обогащения или данных

Таблица Ж.5 – Общие эволюционно ускоренные регионы у трех видов зубатых китов и их аннотация ENCODE cCRE

Координаты ЭУР (hg38)	**ENCODE cCRE ID**	**Класс cCRE**	**Ближайший ген (тип гена; расстояние до TSS, п. н.)**
chr1:96 447 140-96 447 189	–	–	*EEF1A1P11* (процессированный псевдоген; 210)
chr1:162 600 320-162 600 369	–	–	*ENSG00000272574* (длинная некодирующая РНК; 7 217)
chr1:180 442 643-180 442 692	–	–	*MIR3121* (микроРНК; 4 253)
chr1:180 442 693-180 442 742	–	–	*MIR3121* (микроРНК; 4 303)
chr2:32 396 202-32 396 251	–	–	*BIRC6-AS1* (длинная некодирующая РНК; 16 603)
chr2:83 173 814-83 173 863	–	–	*ENSG00000223977* (процессированный псевдоген; 45 242)
chr3:54 019 557-54 019 606	–	–	*ENSG00000288029* (длинная некодирующая РНК; 14 382)
chr3:141 753 922-141 753 971	EH38E4313192	CA-CTCF	*GRK7* (белок-кодирующий; 9 437)
chr4:183 099 131-183 099 180	EH38E2347994	PLS	*WWC2-AS2* (длинная некодирующая РНК; 19)
chr4:183 099 181-183 099 230	EH38E2347994	PLS	*WWC2-AS2* (длинная некодирующая РНК; 0)
chr4:183 099 576-183 099 625	EH38E3618285	PLS	*WWC2* (белок-кодирующий; 84)
chr5:11 904 199-11 904 248	EH38E4361199	pELS	*CTNND2* (белок-кодирующий; 198)
chr7:134 043 084-134 043 133	–	–	*LRGUK* (белок-кодирующий; 84 166)
chr8:121 873 135-121 873 184	–	–	*HAS2-AS1* (длинная некодирующая РНК; 175 523)
chr8:121 873 185-121 873 234	–	–	*HAS2-AS1* (длинная некодирующая РНК; 175 573)
chr9:133 019 693-133 019 742	–	–	*EEF1A1P5* (процессированный псевдоген; 207)
chr10:64 069 515-64 069 564	–	–	*ENSG00000226426* (длинная некодирующая РНК; 32 235)
chr10:69 557 765-69 557 814	–	–	*NEUROG3* (белок-кодирующий; 15 608)
chr10:73 309 336-73 309 385	–	–	*RNU6-833P* (малая ядерная РНК; 30 274)
chr12:12 200 497-12 200 546	–	–	*RNU6-545P* (малая ядерная РНК; 26 128)
chr12:32 695 807-32 695 856	–	–	*ENSG00000257643* (процессированный псевдоген; 2 959)
chr12:43 659 923-43 659 972	–	–	*EEF1A1P17* (процессированный псевдоген; 96)
chr13:43 478 782-43 478 831	–	–	*ENOX1-AS2* (длинная некодирующая РНК; 20 317)

Продолжение таблицы Ж.5

chr14:23 985 568-23 985 617	EH38E4100911	dELS	*DHRS4L2* (белок-кодирующий; 3 201)
chr14:89 840 489-89 840 538	EH38E4113000	CA	*RAB42P1* (процессированный псевдоген; 51 590)
chr15:73 299 840-73 299 889	EH38E4126690	CA	*ENSG00000259650* (длинная некодирующая РНК; 35 371)
chr16:25 300 453-25 300 502	EH38E3174239	dELS	*ZKSCAN2-DT* (длинная некодирующая РНК; 42 501)
chr17:9 447 086-9 447 135	–	–	*ENSG00000225751* (длинная некодирующая РНК; 5 062)
chr22:32 876 612-32 876 661	EH38E4281343	dELS	*TIMP3* (белок-кодирующий; 74 907)

Примечание – PLS (promoter-like signature) – промотороподобный элемент, pELS (proximal enhancer-like signature) – проксимальный энхансероподобный элемент, dELS (distal enhancer-like signature) – дистальный энхансероподобный элемент, CA (chromatin accessibility) – участок доступного хроматина, CA-CTCF (chromatin accessibility with CTCF) – участок доступного хроматина, связанный с фактором CTCF. Ближайшие гены определены по GENCODE v40 Basic. Расстояние до TSS рассчитано от границ ЭУР до ближайшего аннотированного начала транскрипции. Прочерк обозначает отсутствие перекрытия ЭУР с аннотированным cCRE.

Таблица Ж.6 – Основные категории генной онтологии, обогащенные среди генов, связанных с эволюционно ускоренными регионами у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием

Набор генов	**Категория**	**Термин GO**	**GO ID**	**Число генов**	**FDR**
300	BP	nervous system development	GO:0007399	96	$2{,}24 \times 10^{-12}$
300	BP	neurogenesis	GO:0022008	75	$1{,}00 \times 10^{-11}$
300	BP	neuron projection development	GO:0031175	49	$5{,}84 \times 10^{-9}$
300	BP	synapse organization	GO:0050808	25	$3{,}03 \times 10^{-4}$
300	BP	regulation of trans-synaptic signaling	GO:0099177	24	$2{,}13 \times 10^{-4}$
300	BP	modulation of chemical synaptic transmission	GO:0050804	24	$2{,}10 \times 10^{-4}$
300	CC	synapse	GO:0045202	58	$2{,}36 \times 10^{-6}$
300	CC	axon	GO:0030424	29	$8{,}53 \times 10^{-5}$
300	CC	postsynapse	GO:0098794	30	$2{,}23 \times 10^{-4}$
300	CC	postsynaptic density	GO:0014069	20	$8{,}53 \times 10^{-5}$
1208	BP	nervous system development	GO:0007399	302	$1{,}73 \times 10^{-40}$
1208	BP	neurogenesis	GO:0022008	240	$8{,}34 \times 10^{-42}$
1208	BP	synapse organization	GO:0050808	74	$1{,}46 \times 10^{-11}$
1208	BP	response to hormone	GO:0009725	98	$3{,}19 \times 10^{-10}$
1208	BP	endocrine system development	GO:0035270	30	$7{,}33 \times 10^{-10}$
1208	BP	reproductive system development	GO:0061458	40	$2{,}83 \times 10^{-6}$
1208	BP	sex differentiation	GO:0007548	38	$4{,}47 \times 10^{-6}$
1208	BP	gonad development	GO:0008406	31	$2{,}24 \times 10^{-5}$
1208	BP	cellular response to follicle-stimulating hormone stimulus	GO:0071372	6	$6{,}51 \times 10^{-5}$
1208	BP	hormone-mediated signaling pathway	GO:0009755	23	0,016

Примечание – BP (Biological Process) – биологический процесс, CC (Cellular Component) – клеточный компонент. Представлены отдельные статистически значимо обогащенные категории GO (FDR < 0,05). Набор из 300 генов сформирован по непосредственному перекрытию ЭУР с белок-кодирующими генами, набор из 1208 генов – по расположению ЭУР в регуляторных доменах генов. Число генов отражает количество генов соответствующего набора, относящихся к указанной категории GO.

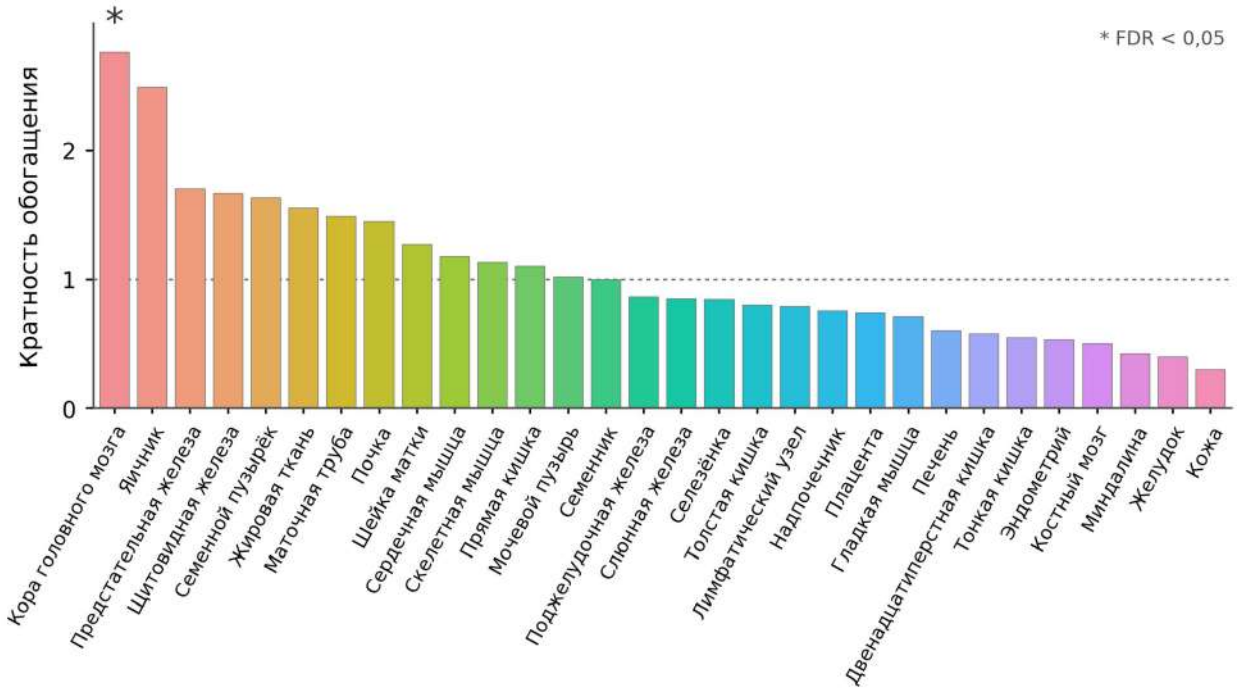


Рисунок Ж.3 – Тканевое обогащение генов, связанных с эволюционно ускоренными регионами у зубатых китов с пострепродуктивным долголетием. Столбцы отражают кратность обогащения генами с тканеспецифичной экспрессией по данным Human Protein Atlas. Звездочкой отмечено статистически значимое обогащение после поправки на множественное тестирование (FDR < 0,05)

Таблица Ж.7 – Гены, в регуляторных доменах которых выявлено не менее пяти эволюционно ускоренных регионов у каждого из трех видов зубатых китов с пострепродуктивным долголетием

Ген	**Количество ЭУР**		
	Косатка	**Нарвал**	**Белуха**
MEF2C	114	7	7
ARRDC4	40	5	6
NUDT12	34	5	6
ZFHX3	5	11	23
ZNF521	7	14	20
ZNF608	9	11	15
BCL11A	5	8	13
MEIS2	12	6	7
DPH6	5	11	5
SOX9	5	5	11
BEND5	10	8	5

CADM1	8	9	10

Продолжение таблицы Ж.7

LSAMP	5	6	10
MSI2	9	10	7
TCF4	5	5	10
LMO4	5	8	8
SS18	6	6	8
NTRK3	5	7	5
QKI	5	7	7
RORA	5	7	7
TENM3	5	5	7
ZNF703	5	5	7
CDH13	5	5	6
NXPE2	5	6	5
SMIM21	5	5	5

ПРИЛОЖЕНИЕ И
Дополнительные результаты интегративного анализа генов, выявленных при исследовании репродуктивного и пострепродуктивного долголетия у плацентарных млекопитающих

Таблица И.1 – Формирование объединенных наборов генов для интегративного анализа

Исследование	Гены, выявленные при анализе ЭУР исследуемых видов	Гены, связанные с общими по координатам ЭУР	Итоговое число уникальных генов
Зубатые киты (пострепродуктивное долголетие)	300 генов, непосредственно перекрывающихся с ЭУР, и 1208 генов, связанных с ЭУР по регуляторным доменам	19 генов, выявленных при аннотации 29 общих ЭУР	1244
Плацентарные млекопитающие (репродуктивное долголетие)	149 генов, непосредственно перекрывающихся с ЭУР, и 960 генов, связанных с ЭУР по регуляторным доменам	63 гена, непосредственно перекрывающихся со 150 общими ЭУР, и 250 генов, связанных с общими ЭУР по регуляторным доменам	1209
Куньи (отложенная имплантация)	55 генов, непосредственно перекрывающихся с ЭУР, и 665 генов, связанных с ЭУР по регуляторным доменам	45 генов, непосредственно перекрывающихся с 59 общими ЭУР, и 89 генов, связанных с этими регионами по регуляторным доменам	753
Соболь (длительное сохранение репродуктивной функции)	419 генов, выявленных в кандидатных регионах генетической дифференциации	Не применимо	419

Таблица И.2 – Гены, связанные с ЭУР зубатых китов и представленные во внешних наборах генов

База данных	Число генов	Гены
Ruth et al. (2021)	31	*ANKRD30A, BIRC6, BLNK, BMP4, BMPR1B, CHD7, DENND1A, EBF3, ELAVL2, ETAA1, FBXL17, FOXO1, FTO, GJA1, GNAS, GPCPD1, IGFBP1, IKZF2, IPO8, MSI2, RBM26, RUNX1, SH3PXD2B, SLMAP, TDRD3, TIPARP, USP3, WNK1, WT1, WWOX, ZNF704*
FeRGI	8	*BNC1, CHD7, FSHR, NR5A1, SOX2, SOX9, TACR3, WT1*

Продолжение таблицы И.2

GenAge	101	*ABL1, ACLY, ADRA1B, AGPAT4, APP, ARFGEF1, ARRDC3, ARRDC4, ATP13A3, BDNF, CACNA1A, CDYL, CELF2, CELF4, CNN3, CSNK2A3, CTNNB1, DGKB, DGKI, DIAPH3, DIS3L2, DMXL2, DOCK1, DOCK2, ECI2, EFEMP1, EIF4EBP3, EIF4G2, ELAVL2, ERCC4, ESR1, FMNL2, FN1, FOS, FOXO1, FOXO3, GAS1, GATB, GCLM, GOT2, GTF2H2, HDAC2, HOXC4, HTR2A, IGF1R, IRS1, ITGB1, KL, LRP2, MAP2K5, MAST4, MELK, MGAT5, MRPS16, MSRA, MYC, NF1, NOVA1, NR3C1, NRG1, NUAK2, PAPPA, PAWR, PCSK6, PEX14, PEX2, PEX5L, PIAS1, PIK3C3, PIK3R1, PLPP7, PPARGC1A, PRKN, PRMT6, RAB28, RFX7, RGS10, RORA, RORB, RPLP1, SIM1, SLC2A2, SLC7A10, SLC7A14, SNX19, SOD3, STAT5B, STRN, SUCLA2, SUCLG2, TBL1XR1, TCP11, TERF1, TSPYL5, TSSK1B, TXNL1, ULK2, VPS8, WDFY1, WDR26, XRCC5*

Таблица И.3 – Гены, связанные с ЭУР плацентарных млекопитающих с репродуктивным долголетием и представленные во внешних наборах генов

База данных	Число генов	Гены
Ruth et al. (2021)	25	*BCL2, BMPR1B, C11ORF58, C16ORF72, DENND1A, EBF3, ELAVL2, ETAA1, GAB2, GJA1, HELB, IKZF2, IPO8, PPP2R3A, RBBP8, RNF220, SLMAP, TBC1D1, TLK1, TSC22D2, WDR12, WWOX, ZCCHC2, ZNF704, ZRANB1*
FeRGI	4	*GREB1L, KISS1R, SOX2, SOX9*
GenAge	92	*ABCC12, ACVR2A, ADCY5, ALDH3A2, ARRDC4, ASIC2, BCL2, BDNF, BUB1B, BUB3, CCND1, CELF4, CERS3, CHL1, CNR1, CREB1, CREB5, CTNNB1, DGKI, DIAPH3, DOCK1, EED, EFEMP1, ELAVL2, ELP4, FHOD3, FMN2, FOLH1, GHR, GPC6, GPD2, HNRNPD, IARS2, IGF1R, ITGB1, JAK2, JUN, LRP2, MAD2L1, MAST2, MAST4, MELK, MRPL33, MSRA, NAALADL2, NACA2, NF1, NFE2L2, NFKB1, NOG, NOVA1, NPAS3, NR1D2, NRG1, NUAK1, OGDHL, OMA1, OSBPL3, PAPPA, PAWR, PEX14, PIK3C3, PIK3R1, PPARGC1A, PRMT6, PSMC4, RAE1, RARB, RFX7, RORA, RORB, RPLP1, RPS12, SIGLEC7, SIK2, SIM1, SLC16A7, SLC22A24, SLC22A25, SNX19, STXBP5, SUMO1, TFAP2A, TOM1L1, TOP2B, TPT1, TXNL1, UCK2, UQCRFS1, VCL, VPS8, WRN*

Таблица И.4 – Гены, связанные с ЭУР куньих с отложенной имплантацией и представленные во внешних наборах генов

База данных	Число генов	Гены
Ruth et al. (2021)	22	*AFF3, BCL2, BMP4, BMPR1B, BTBD1, C11ORF58, CHD7, EBF3, ELAVL2, ETAA1, GJA1, HELB, IGF1, IKZF2, PPP2R3A, RASAL2, TDRD3, TLK1, TRIM33, WDR12, WWOX, ZNF704*
FeRGI	6	*CHD7, FSHR, GREB1L, SOX2, SOX9, TACR3*

Продолжение таблицы И.4

GenAge	62	*ACVR2A, AGPAT4, AGTR1, AP2B1, ARFGEF1, ARRDC3, ATAD2B, ATP2B1, ATP6V0D2, ATP6V1A, BCL2, BMP2K, CELF4, CERS6, CHD1, CPS1, DIAPH3, DPP4, ELAVL2, GHR, GPD2, HIC1, HNRNPD, IGF1, IL7, IRS1, ITGB6, JAK2, KMT2E, MBIP, MFSD1, MGAT5, NAA11, NOG, NRG1, PAPPA, PAPSS1, PEX14, PEX2, PEX5L, PIK3C3, PIK3R1, PMCH, PRMT6, PSD3, RFX7, RORA, RPL10L, SGCD, SLC36A4, SLC7A11, SLC7A13, STRN3, STXBP5L, SUCLG2, SUMO1, TBL1XR1, TSPYL5, TTC32, TUSC3, TXNL1, XRCC5*

Таблица И.5 – Гены, расположенные в кандидатных геномных регионах с признаками отбора у соболей с репродуктивным долголетием и представленные во внешних наборах генов

База данных	Число генов	Гены
Ruth et al. (2021)	6	*PNP, PPARG, PPP2R3A, RBM25, SYCP2L, TP63*
FeRGI	2	*GREB1L, TACR3*
GenAge	41	*ADSS2, APEX1, ATG5, ATP2C1, C2ORF66, CTF1, CYB5R4, DGKD, DGKG, ERN2, FABP4, FABP9, FGF23, FMNL2, HAT1, IGF2BP2, IQSEC1, ITGB5, MAP2K5, MAST3, MGAT5, MRPL3, NAALADL2, NAP1L2, NR1D2, NUDT1, OSBPL10, OSBPL6, PER2, PGAP1, PISD, PMP2, PPARG, PRPS1, PSEN1, RARB, SCNN1B, SGK1, SLC16A1, TP63, XPC*

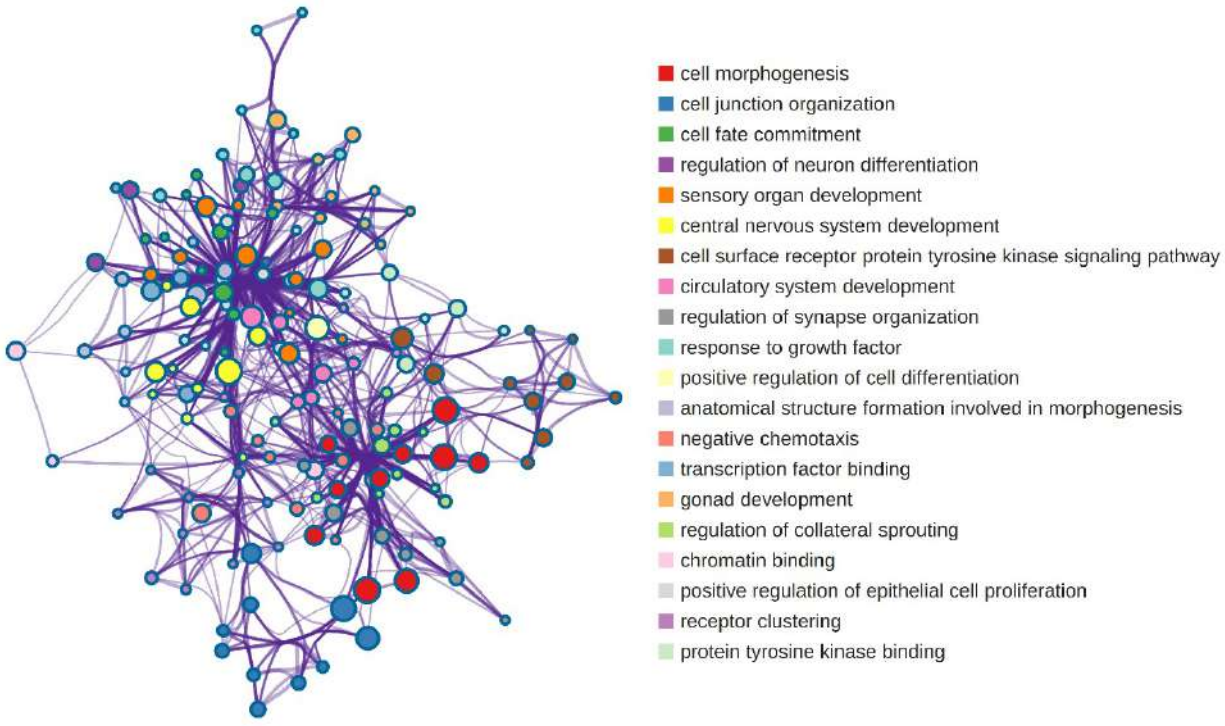


Рисунок И.1 – Сеть функционально обогащенных категорий, выявленных с использованием Metascape при анализе генов, общих для Зубатых китов, Плацентарных млекопитающих и Куньих. Узлы соответствуют обогащенным функциональным категориям, линии отражают их сходство по составу входящих генов, а цвета обозначают принадлежность к функциональным кластерам.

Таблица И.6 – Репрезентативные функционально обогащенные категории Gene Ontology, выявленные при анализе генов, общих для трех исследованных групп млекопитающих.

Кластер Metascape	**Категория**	**GO ID**	**GO term**	**Общих генов**	**Обогащение, ×**	**p-value**	**q-value (BH)**	**Гены**
1	GO:BP	GO:0000902	cell morphogenesis	21	7,89	3,35E-13	6,39E-09	*CDH2, CDH7, CDH8, CDH11, CDH13, EFNA5, EPHA3, EPHA4, EPHA7, GAP43, MEF2C, PROX1, WNT5A, LMO4, NRXN1, AUTS2, CDH20, TENM3, TENM2, PLXNA4, CNTN4*
2	GO:BP	GO:0034330	cell junction organization	19	7,18	2,44E-11	2,33E-07	*CDH2, CDH7, CDH8, CDH11, CDH13, EFNA5, EPHA4, ERBB4, FER, GJA1, PKN2, WNT5A, NRXN1, GPHN, CDH20, TENM3, TENM2, PLXNA4, CNTN4*
3	GO:BP	GO:0045165	cell fate commitment	11	13,26	8,23E-10	1,48E-06	*MEF2C, PROX1, SOX2, SOX5, SOX9, TCF7L2, NR2F2, WNT5A, LMO4, TOX, CYP26B1*
4	GO:BP	GO:0045664	regulation of neuron differentiation	10	15,87	8,52E-10	1,48E-06	*ALK, MEF2C, PROX1, SOX2, SOX9, TCF4, TRIM32, BCL11A, CASZ1, CNTN4*
5	GO:BP	GO:0007423	sensory organ development	15	7,72	1,27E-09	1,87E-06	*BMPR1B, EFNA5, EPHA4, MAF, MEIS1, MEIS2, PROX1, SOX2, SOX9, USH2A, WNT5A, BHLHE22, TENM3, CYP26B1, LRIG3*
6	GO:BP	GO:0007417	central nervous system development	20	5,23	1,81E-09	2,46E-06	*DAB1, EPHA4, EPHA7, ERBB4, FOXG1, NRG1, MEIS1, MEIS2, PROX1, RORA, SOX2, SOX9, WNT5A, LMO4, NRXN1, TOX, CYP26B1, PLXNA4, CNTN4, VPS13B*
7	GO:BP	GO:0007169	cell surface receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	14	6,98	1,66E-08	1,44E-05	*ALK, ANGPT1, EFNA5, EPHA3, EPHA4, EPHA7, ERBB4, FER, GFRA1, GRB14, NRG1, PIK3R1, PRKD1, SOX9*

Продолжение таблицы И.6

8	GO:BP	GO:0072359	circulatory system development	17	5,17	3,81E-08	3,03E-05	*ANGPT1, CDH11, CDH13, ERBB4, GJA1, NRG1, MEF2C, MEIS1, PROX1, RORA, SOX9, TCF7L2, NR2F2, WNT5A, NRXN1, ZFPM2, PLXNA4*
9	GO:BP	GO:0050807	regulation of synapse organization	12	7,52	8,14E-08	5,75E-05	*CDH2, CDH8, DAB1, EFNA5, EPHA4, EPHA7, LSAMP, MEF2C, WNT5A, NRXN1, LRRTM1, LRRTM3*
10	GO:BP	GO:0070848	response to growth factor	14	5,82	1,55E-07	8,71E-05	*APAF1, BMPR1B, FER, GFRA1, MEF2C, MEIS2, PDE3A, PRKD1, SOX2, SOX5, SOX9, WNT5A, MAGI2, WWOX*
11	GO:BP	GO:0045597	positive regulation of cell differentiation	18	4,39	1,73E-07	9,42E-05	*BMPR1B, CDH2, EFNA5, EPHA4, GJA1, NRG1, MEF2C, PRKD1, PROX1, SOX5, SOX9, TCF4, TCF7L2, TRIM32, BCL11A, CYP26B1, ARID1B, PKDCC*
12	GO:BP	GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	15	4,58	1,14E-06	4,25E-04	*ANGPT1, CDH11, CDH13, DAB1, MEF2C, MEIS1, PROX1, RORA, SOX2, SOX9, WNT5A, LMO4, NRXN1, VPS13B, IZUMO3*
13	GO:BP	GO:0050919	negative chemotaxis	5	22,14	3,08E-06	9,03E-04	*EFNA5, EPHA7, NRG1, WNT5A, PLXNA4*
14	GO:MF	GO:0008134	transcription factor binding	14	4,49	3,29E-06	9,52E-04	*RUNX1T1, MEF2C, MEIS2, PROX1, RORA, SOX9, TCF4, TCF7L2, TCF12, LMO4, C1D, TRIM32, ZFPM2, BCL11A*
15	GO:BP	GO:0008406	gonad development	7	10,66	4,59E-06	1,27E-03	*BMPR1B, FER, GFRA1, GJA1, SOX9, NR2F2, WNT5A*
16	GO:BP	GO:0048670	regulation of collateral sprouting	3	47,60	3,02E-05	5,39E-03	*EFNA5, EPHA7, BCL11A*
17	GO:MF	GO:0003682	chromatin binding	13	3,86	3,66E-05	6,29E-03	*ONECUT1, MEIS1, SOX9, TCF4, TCF7L2, TOX, SATB2, KAT6B, AUTS2, PRMT6, ARID1B, ASXL3, H3-7*
18	GO:BP	GO:0050679	positive regulation of epithelial cell proliferation	7	7,70	3,80E-05	6,41E-03	*CDH13, ERBB4, PRKD1, PROX1, SOX9, TCF7L2, WNT5A*

Продолжение таблицы И.6

19	GO:BP	GO:0043113	receptor clustering	4	20,58	4,23E-05	6,89E-03	*CDH2, NRXN1, MAGI2, GPHN*
20	GO:MF	GO:1990782	protein tyrosine kinase binding	6	9,52	4,26E-05	6,89E-03	*ANGPT1, EPHA4, GJA1, GRB14, NRG1, PIK3R1*
21	GO:BP	GO:0044089	positive regulation of cellular component biogenesis	11	4,36	5,02E-05	7,98E-03	*EFNA5, FER, NRG1, PIK3R1, PRKD1, NRXN1, TRIM32, AUTS2, TENM2, LRRTM1, LRRTM3*
22	GO:BP	GO:0008045	motor neuron axon guidance	3	35,70	7,57E-05	1,09E-02	*EPHA4, LMO4, PLXNA4*
23	GO:BP	GO:0051896	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal transduction	8	5,70	8,89E-05	1,24E-02	*ANGPT1, EFNA5, EPHA7, PRKD1, TCF7L2, WNT5A, NRXN1, MAGI2*
24	GO:BP	GO:0031016	pancreas development	4	16,56	1,01E-04	1,37E-02	*CDH2, MEIS2, PROX1, TCF7L2*
26	GO:BP	GO:0045599	negative regulation of fat cell differentiation	4	14,10	1,89E-04	2,26E-02	*RUNX1T1, RORA, WNT5A, ZFPM2*
27	GO:MF	GO:0001227	DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific	8	5,04	2,07E-04	2,41E-02	*PROX1, TCF7L2, NR2F1, NR2F2, TRPS1, ZBTB20, BCL11A, ZBTB10*
28	GO:MF	GO:0004879	nuclear receptor activity	4	12,91	2,66E-04	2,89E-02	*PDE3A, RORA, NR2F1, NR2F2*

Таблица И.7 – Результаты оценки статистической значимости попарных пересечений наборов генов

Наборы	Общие гены	Ожидаемое	Обогащение	*p*	FDR
1-2	407	79,16	5,14	$6{,}84\times10^{-196}$	$1{,}44\times10^{-194}$
1-3	292	49,30	5,92	$2{,}57\times10^{-155}$	$1{,}80\times10^{-154}$
1-4	42	27,43	1,53	0,00398	0,00835
1-5	31	18,53	1,67	0,00345	0,00804
1-6	8	6,87	1,16	0,3818	0,5346
1-7	101	99,78	1,01	0,4639	0,5731
2-3	292	47,91	6,09	$4{,}75\times10^{-159}$	$4{,}99\times10^{-158}$
2-4	47	26,66	1,76	0,000112	0,000393
2-5	25	18,01	1,39	0,06069	0,1062
2-6	4	6,68	0,60	0,9080	0,9080
2-7	92	96,97	0,95	0,7225	0,7587
3-4	34	16,61	2,05	$6{,}64\times10^{-5}$	0,000279
3-5	22	11,22	1,96	0,00211	0,00555
3-6	6	4,16	1,44	0,2374	0,3560
3-7	62	60,40	1,03	0,4333	0,5687
4-5	6	6,24	0,96	0,5957	0,6950
4-6	2	2,32	0,86	0,6769	0,7481
4-7	41	33,61	1,22	0,1072	0,1731
5-6	9	1,56	5,75	$2{,}74\times10^{-5}$	0,000144
5-7	39	22,70	1,72	0,000626	0,00188
6-7	16	8,42	1,90	0,00937	0,01789

Примечание – 1 – зубатые киты, 2 – плацентарные млекопитающие, 3 – куньи, 4 – соболь, 5 – ReproGen, 6 – FeRGI, 7 – GenAge. *p* – значение, полученное односторонним гипергеометрическим тестом, FDR – значение с поправкой Бенджамини–Хохберга.