



Кэтрин Поллард

При сравнении геномов человека и шимпанзе удалось выявить небольшие участки ДНК, присущие исключительно людям

РАЗЛИЧИЕ В 1%: люди отличаются от шимпанзе во многих отношениях, хотя почти на 99% ДНК у них одна и та же; новые исследования выявляют области генома, делающие наши виды разными

ЧТО ДЕЛАЕТ НАС ЛЮДЬМИ?

Шесть лет назад я с радостью воспользовалась возможностью присоединиться к международной группе ученых, изучающих последовательности нуклеотидов или «букв», из которых составлена ДНК, в геноме обыкновенного шимпанзе (*Pan troglodytes*). Поскольку я занимаюсь биологической статистикой и давно интересуюсь происхождением человека, я хотела сравнить ДНК человека с ДНК нашего ближайшего родственника. Результат может показаться для нас унижительным: почти на 99% ДНК человека и шимпанзе оказались идентичными. Другими словами, из 3 млрд букв, составляющих геном человека, лишь 15 млн

(менее 1%) изменились за последние 6 млн лет, прошедших с момента расхождения наших эволюционных путей.

Теоретически большая часть изменений вообще никак не повлияла на нашу биологию, однако где-то среди 15 млн нуклеотидов лежат именно те отличия, которые и делают нас людьми. Я набралась решимости их отыскать, и в результате мне удалось добиться значительных успехов.

Первый сюрприз

Несмотря на то что эти несколько миллионов нуклеотидов составляют малую долю человеческого генома, они все равно остаются необоз-

римо обширным полем для исследований. Чтобы ускорить поиск, я написала компьютерную программу, которая ищет в человеческом геноме участки ДНК, изменившиеся сильнее всего с момента разделения родословных человека и шимпанзе. Поскольку большая часть случайных генетических мутаций не приносит организму ни вреда, ни пользы, они накапливаются с постоянной скоростью; по ним можно судить о времени, минувшем с момента обособления двух видов, произошедших от общего предка (скорость накопления таких изменений называют ходом молекулярных часов). Ускорение темпов накопления модификаций в некоторой части

генома говорит о положительном давлении естественного отбора, когда мутации, увеличивающие шансы организма на выживание и размножение, передаются потомкам с повышенной вероятностью. Другими словами, части кода, претерпевшие наибольшие изменения со времени разделения человека и шимпанзе, скорее всего и представляют собой как раз те самые последовательности, благодаря которым человек стал человеком.

В ноябре 2004 г., потратив месяцы на отладку и оптимизацию программы, мы вместе с моим руководителем Дэвидом Хосслером (David Haussler) запустили ее на огромном кластере вычислительных машин в Калифорнийском университете в Санта-Крузе и получили файл с ранжированным списком быстро изменявшихся последовательностей. Первым номером в списке стояла последовательность из 118 нуклеотидов, которую назвали *HARI* (от *human accelerated regions* — зоны ускоренного развития у человека). Воспользовавшись базой данных в Калифорнийском университете в Санта-Крузе, я стала искать информацию по *HARI*. База данных содержала последовательность *HARI* человека, мыши, крысы и курицы — всех видов позвоночных, геном которых был расшифрован к тому времени. Удалось также выяснить, что в крупномасштабных скрининговых экспериментах активность *HARI* была выявлена в двух образцах клеток мозга человека, хотя данная последовательность еще не получила названия и не была никем исследована. Мы хором воскликнули: «Потрясающе!» — ведь *HARI* могла быть частью гена, активного в мозге и еще не известного науке.

Нам выпала невероятная удача. Известно, что человеческий мозг отличается от мозга шимпанзе по размеру, организации, степени сложности и другим особенностям, однако эмбриологические и эволюционные механизмы, лежащие в основе таких различий, все еще остаются почти неизвестными. *HARI* обещала пролить свет на один

из самых загадочных аспектов биологии человека.

Мы потратили год на то, чтобы выяснить как можно больше об эволюционной истории *HARI*, сравнивая эту область генома у различных видов, включая еще 12 видов позвоночных, геном которых к тому времени был секвенирован. Оказалось, что до момента появления человека *HARI* эволюционировала чрезвычайно медленно. У кур и шимпанзе (пути которых в эволюции разошлись около 300 млн лет назад) в ней различаются лишь два из 118 нуклеотидов, в то время как человека и шимпанзе, произошедших от одного предка совсем недавно, разделяют целых 18 различий. То, что *HARI* оставалась практически неизменной на протяжении сотен миллионов лет, говорит о том, что она отвечает за нечто чрезвычайно важное; резкое изменение этой последовательности у людей указывает на значительную модификацию ее функции, произошедшую у непосредственных предков человека.

Важные сведения о функции *HARI* в мозге появились в 2005 г., после того как соавтор нашей работы Пьер Вандерхаген (Pierre Vanderhaeghen) из Брюссельского свободного университета получил в нашей лаборатории в Санта-Крузе ампулу с синтезированными *HARI*. С их помощью он создал флуоресцентную молекулярную метку, указывавшую на место активации *HARI* в живых клетках — т.е. на транскрипцию информации с ДНК на РНК. Когда в клетке включаются гены, она сначала производит подвижную информационную РНК и затем использует ее в качестве матрицы для синтеза необходимых ей белков. Метка показала, что *HARI* активна в той разновидности нейронов, которая игра-

ет важнейшую роль в формировании развивающейся коры больших полушарий (наружного слоя мозга, образующего борозды и извилины). Если с нейронами что-нибудь происходит не так, то возникает тяжелое и часто смертельное врожденное заболевание — лиссэнцефалия (буквально «гладкий мозг»), при котором в коре отсутствует характерная для нее складчатость, а ее площадь значительно снижена. Нарушение работы этих нейронов связывают также с развитием шизофрении.

Таким образом, *HARI*, активируясь в нужное время и в нужном месте, обеспечивает правильное формирование коры (имеются указания на то, что она также играет некоторую роль в сперматогенезе). Однако то, как именно данный фрагмент генетического кода влияет на развитие мозга, остается загадкой, которую мы стремимся разгадать.

Помимо интересной эволюционной истории *HARI* имеет еще одну особенность — она не кодирует белок. Десятилетиями исследования в области молекулярной биологии были в основном направлены на изучение генов, кодирующих белки, строительные кирпичики наших клеток. Однако благодаря проекту «Геном человека», в ходе которого было проведено секвенирование нашего собственного генома, ученые обнаружили, что гены, кодирующие протеины, составляют всего лишь 1,5% нашей ДНК. Остальные 98,5% (называемые иногда «бесплодной ДНК») содержат регуляторные последовательности, сообщающие другим генам, когда им следует включаться и выключаться, а также гены, кодирующие РНК, которая не транслируется в белки.

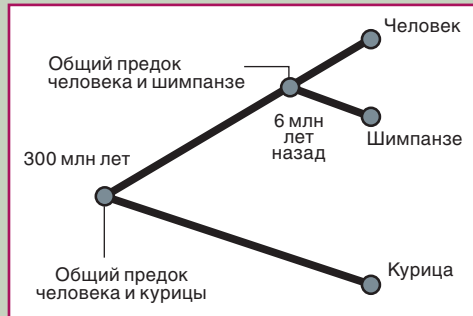
Исходя из структуры последовательности *HARI* мы предсказали,

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- Шимпанзе — самые близкие к нам из числа ныне живущих родственников человека. ДНК человека и шимпанзе оказались идентичными почти на 99%.
- Поиск участков генома человека, изменившихся сильнее всего после расхождения наших эволюционных путей с шимпанзе, позволил обнаружить последовательности ДНК, делающие нас людьми.
- Эти открытия также позволили понять, почему шимпанзе и люди различаются столь сильно, при том что обладают практически идентичными генетическими программами.

СКАНИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Для того, чтобы выяснить, какие части нашего генома делают нас людьми, была создана компьютерная программа, ведущая поиск последовательностей ДНК, изменившихся сильнее всего с момента расхождения эволюционных путей людей и шимпанзе. Во главе получившегося списка стоял 118-буквенный фрагмент кода, названный *HAR1*. Данная область генома очень мало менялась на протяжении большей части эволюции позвоночных: у шимпанзе и курицы она различается всего на две буквы. Однако различие в этой последовательности у человека и шимпанзе составляет целых 18 букв, и это говорит о том, что *HAR1* приобрел у людей важную новую функцию



T	G	A	A	A	C	G	G	A	G	G	A	G	A	C	G	T	T	A	C
A	G	C	A	A	C	G	T	G	T	C	A	G	C	T	G	A	A	A	T
G	A	T	G	G	C	G	T	A	G	A	C	G	C	A	C	G	T	C	
A	G	C	G	G	C	G	G	A	A	A	T	G	G	T	T	T	C	T	A
T	C	A	A	A	A	T	G	A	A	A	G	T	G	T	T	T	A	G	A
G	A	T	T	T	C	C	T	C	A	A	G	T	T	T	C	A			

Изменения в последовательности у человека в сравнении с шимпанзе



T	G	A	A	A	T	G	G	A	G	G	A	G	A	A	A	T	T	A	C
A	G	C	A	A	T	T	T	A	T	C	A	A	C	T	G	A	A	A	T
T	A	T	A	G	G	T	G	T	A	G	A	C	A	C	A	T	G	T	C
A	G	C	A	G	T	G	G	A	A	A	T	A	G	T	T	T	C	T	A
T	C	A	A	A	A	T	T	A	A	A	G	T	A	T	T	T	A	G	A
G	A	T	T	T	C	C	T	C	A	A	A	T	T	T	C	A			

Изменения в последовательности у шимпанзе в сравнении с курицей



T	G	A	A	A	T	G	G	A	G	G	A	G	A	A	A	T	T	A	C
A	G	C	A	A	T	T	T	A	T	C	A	A	C	T	G	A	A	A	T
T	A	T	A	G	G	T	G	T	A	G	A	C	A	C	A	T	G	T	C
A	G	C	A	G	T	A	G	A	A	A	C	A	G	T	T	T	C	T	A
T	C	A	A	A	A	T	T	A	A	A	G	T	A	T	T	T	A	G	A
G	A	T	T	T	C	C	T	C	A	A	A	T	T	T	C	A			

что она кодирует РНК, а в 2006 г. Софи Салама (Sofie Salama), Холлер Айгел (Haller Igel) и Мануэль Арес (Manuel Ares) из Калифорнийского университета в Санта-Крузе подтвердили это лабораторными экспериментами. Оказывается, человеческая *HAR1* располагается в двух перекрывающихся генах. Общая для них последовательность *HAR1* является представителем совершенно нового структурного типа

РНК, обнаруженного сверх шести известных классов генов РНК. Эти шесть важнейших групп охватывают более 1 тыс. различных семейств генов РНК, которые различаются структурой и функцией кодируемой ими РНК. *HAR1* также представляет собой первый известный нам пример последовательности, кодирующей РНК, которая подвергалась положительному давлению естественного отбора.

Может показаться удивительным, что никто не обратил внимания на эти 118 нуклеотидов человеческого генома раньше. Однако отсутствие технологии для эффективного сравнения целых геномов не позволяло исследователям заметить, что *HAR1* чем-то выделялся на фоне остальной «бесполезной» ДНК.

О чем рассказала речь

Сравнение целых геномов других видов помогло также разобраться в том, почему люди и шимпанзе столь отличаются друг от друга, несмотря на большое сходство их геномов. За последние годы были секвенированы геномы тысяч видов (в основном микроорганизмов). Оказалось, что наибольшее значение имеет то, в какой именно части генома происходят изменения, а не общее их количество. Другими словами, вам не нужно сильно изменять геном для создания нового вида. Для того чтобы наш общий с шимпанзе предок превратился в человека, не было необходимости ускорять ход молекулярных часов в целом. Секрет состоял в том, чтобы быстро внести изменения в те места, где они окажут значительное влияние на функционирование всего организма.

Очевидно, что *HAR1* — это как раз такое место. То же самое можно сказать о гене *FOXP2*, содержащем другую выявленную мной быстроизменяющуюся последовательность. Известно, что она связана с речью: в 2001 г. исследователи из Оксфордского университета в Англии сообщили, что люди, несущие мутации в этом гене, не способны производить некоторые быстрые движения мышц лица, необходимые для артикуляции слов, несмотря на то что они обладают нормальными когнитивными речевыми способностями. В норме данная последовательность имеет несколько отличий от аналогичной у шимпанзе: две замены нуклеотидов, изменивших ее белковый продукт, и множество других замен, которые, видимо, повлияли на то, как, когда и где этот белок используется в теле человека.

Недавнее открытие пролило некоторый свет на вопрос о том, когда у гоминидов появилась пригодная для речи версия *FOXP2*. В 2007 г. ученые из Института эволюционной антропологии Макса Планка в Лейпциге, Германия, секвенировали *FOXP2*, извлеченный из останков неандертальцев, и обнаружили, что эти вымершие люди обладали современной человеческой версией этого гена. Вполне вероятно, что они могли разговаривать так же, как и мы. Новейшие оценки времени обособления эволюционных линий неандертальцев и современного человека указывают на то, что новая форма *FOXP2* появилась не позднее полумиллиона лет назад. Однако большинство признаков, отличающих человеческую речь от звуковой коммуникации у других животных, обусловлены не физическими данными, а когнитивными способностями, которые часто коррелируют с размером мозга. Как правило, приматы имеют относительно более крупный мозг в сопоставлении с размерами тела, однако объем человеческого мозга увеличился еще в три с лишним раза по сравнению с объемом мозга общего предка человека и шимпанзе, и причины такого резкого увеличения ученые начинают исследовать только сейчас.

Один из наиболее хорошо изученных генов, связанных с размером мозга у человека и других приматов, — *ASPM*. Генетические исследования случаев микроцефалии, при которой размер мозга человека может снижаться на 70%, выявили, что в регулировании размеров мозга участвуют *ASPM* и еще три гена: *MCPH1*, *CDK5RAP2* и *CENPJ*. Чуть позднее исследователи из Чикагского университета и Мичиганского университета в Анн-Арборе показали, что по ходу эволюции приматов *ASPM* несколько раз претерпевал значительные изменения и, следовательно, подвергался положительному давлению естественного отбора. По крайней мере один из таких периодов изменений приходится на отрезок эволюции человека уже после обособления от предков шим-

панзе; вероятно, в этом заключается одна из потенциальных причин увеличения нашего мозга.

Другие части генома могли влиять на метаморфоз человеческого мозга более косвенно. Компьютерное сравнение геномов, выявившее *HAR1*, позволило также обнаружить еще 201 область, претерпевшую быстрые изменения в эволюции человека, большая часть из которых не кодирует ни белков, ни даже РНК. (Похожее исследование, проведенное в Институте Сенгера в Кембридже, Великобритания, выявило многие из тех же самых областей *HAR*). Скорее всего, данные области представляют собой регуляторные последовательности, обеспечивающие включение и выключение расположенных рядом с ними генов. Поразительно то, что более половины генов, расположенных рядом с областями *HAR*, участвуют в развитии и функционировании мозга. Как и в случае *FOXP2*, продукты многих из них заняты регуляцией других генов. Таким образом, несмотря на то что области *HAR* составляют незначительную часть генома, изменения в этих областях могут значительно изменить человеческий мозг путем влияния на активность множества взаимосвязанных генов.

За пределами мозга

Несмотря на то что в большей части генетических исследований специалисты интересовались эволюцией нашего сложнейшего мозга, они также выясняли, как сформировались и другие особенности человеческого тела. Регуляторная область *HAR2*, вторая по счету в моем списке участков генома, претерпевших наибольшие изменения, — пример как раз такого рода. В 2008 г. иссле-

дователи из Национальной лаборатории им. Лоуренса в Беркли показали, что специфические отличия человеческой версии последовательности *HAR2* (известной также как *HACNS1*), позволяет данному участку ДНК управлять активностью генов в запястье и большом пальце руки во время их формирования, а предковая форма у других приматов делать этого не может. Такое открытие выглядит чрезвычайно интересным, поскольку может указывать на морфологические изменения руки человека, которые позволили людям обрести ловкость, необходимую для производства и использования сложных орудий труда.

Помимо морфологических изменений наши предки претерпели также поведенческие и физиологические перестройки, которые помогли им адаптироваться к изменяющимся условиям и мигрировать в другие регионы. Например, освоение огня, произошедшее более миллиона лет назад, и сельскохозяйственная революция, случившаяся около 10 тыс. лет назад, сделали более доступной пищу, богатую крахмалом. Однако одних лишь изменений в культуре было недостаточно для того, чтобы использовать калорийную пищу — наши предки должны были адаптироваться к ней генетически.

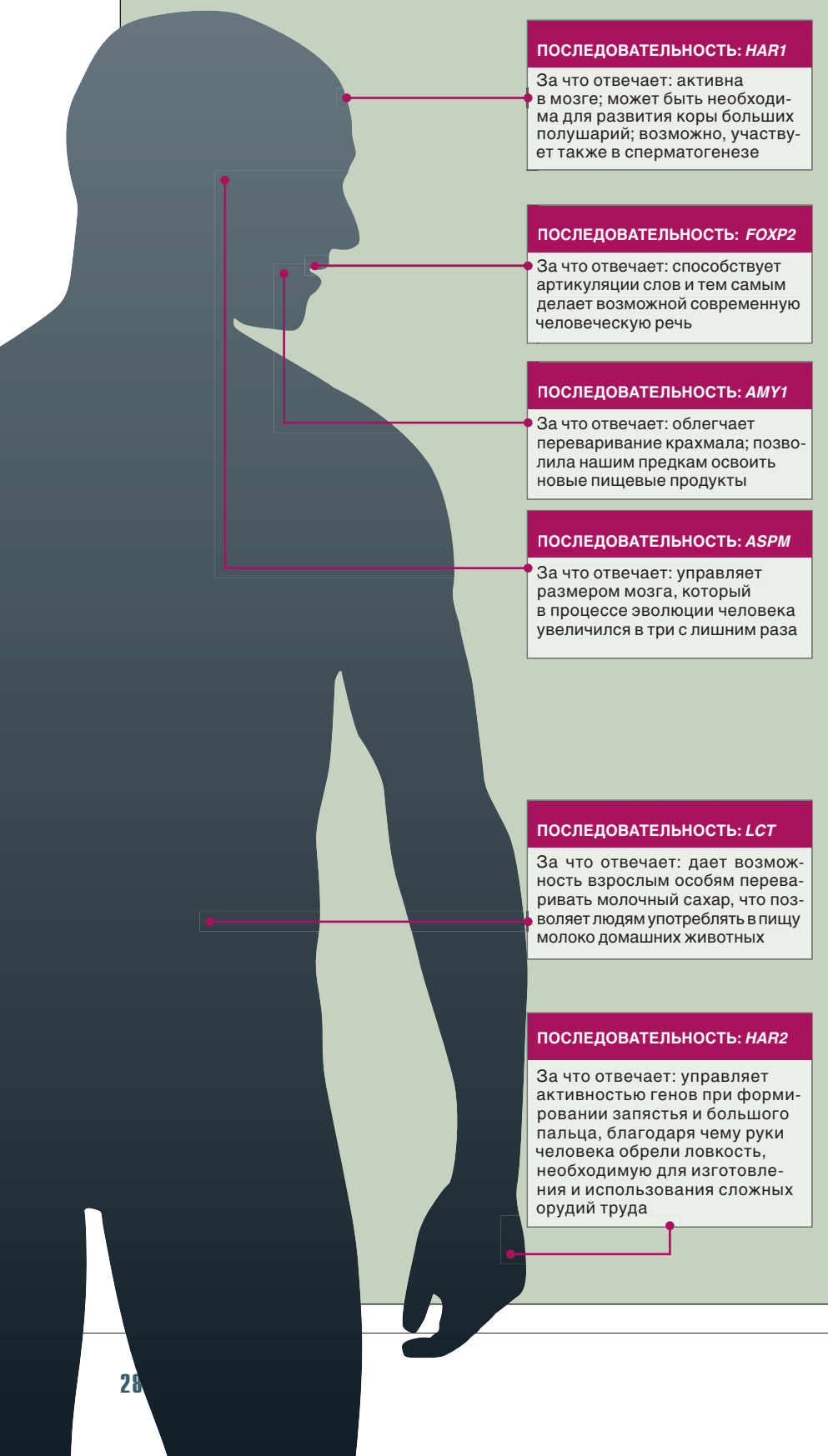
Изменения в гене *AMY1*, который кодирует амилазу слюны — фермента, участвующего в переваривании крахмала, — составляет одну из хорошо известных адаптаций такого рода. Геном млекопитающих содержит множество копий этого гена, причем их количество может различаться у представителей разных видов и даже у разных людей. Однако в целом люди имеют особен-

ОБ АВТОРЕ

Кэтрин Поллард (Katherine S. Pollard) — специалист по биологической статистике из Калифорнийского университета в Сан-Франциско. В 2003 г. после получения научной степени она участвовала в секвенировании генома шимпанзе. Поллард использовала эти данные для того, чтобы выявить наиболее быстро эволюционировавшие области человеческого генома. Недавно начала изучать эволюцию микробов, живущих в теле человека.

ОСОБЕННАЯ ДНК

Попытки обнаружить ДНК, уникальную для человека, выявили несколько последовательностей, которые отличают человека от шимпанзе. Неполный список таких последовательностей с указанием некоторых их функций приведен ниже



ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: *NAI1*

За что отвечает: активна в мозге; может быть необходима для развития коры больших полушарий; возможно, участвует также в сперматогенезе

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: *FOXP2*

За что отвечает: способствует артикуляции слов и тем самым делает возможной современную человеческую речь

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: *AMY1*

За что отвечает: облегчает переваривание крахмала; позволила нашим предкам освоить новые пищевые продукты

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: *ASPM*

За что отвечает: управляет размером мозга, который в процессе эволюции человека увеличился в три с лишним раза

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: *LCT*

За что отвечает: дает возможность взрослым особям переваривать молочный сахар, что позволяет людям употреблять в пищу молоко домашних животных

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: *NR2*

За что отвечает: управляет активностью генов при формировании запястья и большого пальца, благодаря чему руки человека обрели ловкость, необходимую для изготовления и использования сложных орудий труда

но большое количество копий *AMY1* в сравнении с другими приматами. В 2007 г. генетики из Университета штата Аризона показали, что люди, имеющие больше копий *AMY1*, обладают большим количеством амилазы в слюне, что позволяет им переваривать больше крахмала. Таким образом, эволюция *AMY1* коснулась как количества копий данного гена, так и конкретной последовательности нуклеотидов ДНК.

Еще один известный пример пищевой адаптации связан с геном лактазы (*LCT*) — фермента, позволяющего млекопитающим переваривать лактозу, или молочный сахар. У большинства видов усваивать лактозу способны лишь детеныши, сосущие молоко. Но примерно 9 тыс. лет назад (в эволюционном масштабе совсем недавно) изменения в человеческом геноме привели к появлению версии *LCT*, позволяющей переваривать лактозу также и взрослым особям. Модификация гена возникла у населения Европы и Африки независимо и дала возможность носителям данного гена пить молоко домашних животных. Многие жители Азии, Латинской Америки и других частей света отличаются непереносимостью лактозы, поскольку несут в себе предковую версию этого гена.

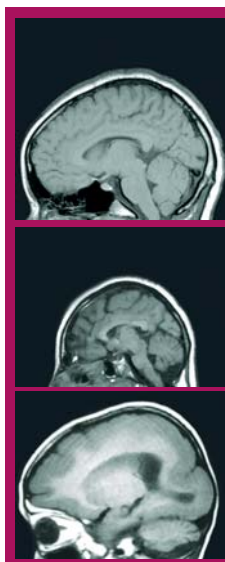
LCT — не единственный эволюционирующий у людей в наше время ген. Проект изучения генома шимпанзе выявил еще 15 генов, которые были нормальны для наших предков — обезьян и других млекопитающих, однако в своей предковой форме у человека они связаны с такими заболеваниями, как болезнь Альцгеймера и рак. В настоящее время ученые исследуют функции этих генов и пытаются установить, почему их предковые версии стали для нас неадаптивными. Такие исследования помогут медикам выявлять людей, подверженных повышенному риску развития любого из этих смертельно опасных заболеваний, и помогать им сохранять здоровье, а также разрабатывать новые способы лечения.

Вместе с хорошим приходит и плохое

На протяжении всей эволюции люди, как и все другие живые существа, должны были постоянно сражаться с инфекциями — и те, кому это удавалось, передавали свои гены потомкам. Такая битва больше всего сказывается на иммунной системе. Когда исследователи изучают человеческий геном в поисках положительного давления естественного отбора, часто на самом вершине списка оказываются гены, связанные с иммунитетом. Неудивительно, что эволюция относится к ним столь трепетно:

в отсутствие антибиотиков и вакцин самым вероятным препятствием, не позволяющим индивиду передавать свои гены последующим поколениям, может оказаться смертельно опасное инфекционное заболевание. Еще больше ускоряет эволюцию иммунной системы постоянная адаптация патогенных организмов к нашей защите против них, что ведет к эволюционной «гонке вооружений» между микробами и их хозяевами.

Следы таких битв сохранились в нашей ДНК. В наибольшей степени это относится к ретровирусам, подобным ВИЧ, которые живут и размножаются благодаря тому, что внедряют свой генетический материал в наши геномы. Человеческая ДНК изрядно засорена копиями коротких ретровирусных геномов, многие из которых принадлежали вирусам, вызывавшим заболевания миллионы лет назад и уже, возможно, не циркулирующим в природе. Со временем в ретровирусных последовательностях, как и в любой другой ДНК, накапливаются случайные мутации, в результате чего различные копии теряют свою идентичность. Оценивая степень дивергенции между такими копиями, исследователи могут применить метод молекулярных часов и датировать момент исходного ретровирусного заражения. Шрамы от



ГЕНЫ, ФОРМИРУЮЩИЕ МОЗГ: изменения в определенных последовательностях генома могут драматически сказаться на мозге. Например, мутация гена *ASPM* ведет к значительному снижению размеров мозга (посередине) в сравнении с нормальным мозгом (вверху), что указывает на ключевую роль этого гена в формировании данного органа в ходе эволюции человека. Нарушенное функционирование нейронов, в которых в период развития активен ген *HAR1*, может привести к тяжелой аномалии, при которой не образуются складки коры больших полушарий (внизу), и это говорит о том, что *HAR1* абсолютно необходим для нормального формирования коры

древних инфекций заметны также в генах иммунной системы, которые постоянно адаптируются к борьбе с непрерывно эволюционирующими ретровирусами.

PtERV1 представляет собой один из таких реликтовых вирусов. У современного человека имеется белок *TRIM5α*, который защищает от *PtERV1* и родственных ему вирусов, не давая им размножаться. Генетический анализ показывает, что эпидемии *PtERV1* преследовали древних шимпанзе, горилл и людей, живших в Африке около 4 млн лет назад. Чтобы понять, как различные приматы реагировали на *PtERV1*, в 2007 г. специалисты из Онкологического исследовательского центра им. Фреда Хатчинсона в Сиэтле использовали множество копий со случайными мутациями из генома шимпанзе для того, чтобы реконструировать исходную последовательность *PtERV1* и воссоздать этот древний ретровирус. Затем они провели эксперименты, чтобы посмотреть, насколько хорошо современные версии гена *TRIM5α* у людей и человекообразных обезьян способны подавлять активность воскрешенного вируса. Полученные результаты показали, что, по всей видимости, одно изменение в человеческом *TRIM5α* позволило нашим предкам справляться с инфекцией *PtERV1* с большей эффективностью, чем родственным нам

приматам (другие изменения в человеческом *TRIM5α* могли развиваться в ответ на какие-то иные ретровирусы).

Победа над одним ретровирусом не обязательно гарантирует успех в борьбе против других. Изменения в человеческом *TRIM5α*, видимо, позволили нам победить *PtERV1*, но они же затруднили борьбу против ВИЧ. Это открытие позволяет исследователям понять, почему ВИЧ-инфекция ведет к СПИДу только у людей, но не у других приматов. Возникает такое впечатление, что эволюция может после шага вперед сделать два назад. Однако наши

научные исследования тоже иногда оказываются в подобном положении. Мы идентифицировали множество генетических последовательностей — замечательных кандидатов на объяснение генетических причин отличительных свойств человека, однако в большинстве случаев мы практически ничего не знаем о функциях этих генетических последовательностей. Пробелы в наших знаниях особенно велики для таких областей, как *HAR1* и *HAR2*, в которых не кодируются никакие белки.

Быстро эволюционировавшие последовательности, присущие только человеку, указывают нам, куда следует двигаться дальше. Видимо, мы стали людьми не столько из-за изменений в белковых строительных кирпичиках нашего организма, сколько благодаря тому, что в ходе эволюции изменились время и место включения и выключения генов, ответственных за их производство. Экспериментальные исследования и компьютерное моделирование, проводящиеся в настоящее время в тысячах лабораторий во всем мире, обещают раскрыть, что же происходит в этих 98,5% нашего генома, которые не кодируют никаких белков, но с каждым днем представляются нам все менее и менее «бесполезными». ■

Перевод: Б.В. Чернышев